

Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



Renin ELISA



DE5125



96



Demeditec Diagnostics GmbH
Lise-Meitner-Strasse 2
24145 Kiel – Germany
www.demeditec.com

**Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.
Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.
Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.
Utilisez seulement la version valide des Instructions d'utilisation fournies avec le kit.**

| Introduced modifications / Durchgeführte Änderungen / Modifiche introdotte / Modificaciones introducidas / Modifications apportées / Modificações introduzidas | |
|--|---|
| <p>The following changes have been made in comparison to the previous version: Im Vergleich zur Vorgängerversion wurden folgende Änderungen vorgenommen: Rispetto alla versione precedente, sono state apportate le seguenti modifiche: Se han introducido los siguientes cambios en comparación con la versión anterior: Les modifications suivantes ont été apportées par rapport à la version précédente : Foram efetuadas as seguintes alterações em comparação com a versão anterior:</p> | |
| <p>Detailed editorial revision. Changed wording in several chapters. Ausführliche redaktionelle Überarbeitung. Geänderter Wortlaut in mehreren Kapiteln. Revisione editoriale dettagliata. Modificato il testo in diversi capitoli. Revisión editorial detallada. Se ha cambiado la redacción de algunos capítulos. Révision éditoriale détaillée. Modification de la formulation dans plusieurs chapitres. Revisão editorial detalhada. Texto alterado em vários capítulos.</p> | |
| 4.2 Materials required but not provided: | Microplate shaker, 400 rpm (old: 300 - 700 rpm); |
| 5.2 Samples Storage: | Addition of the following: "To inactivate activated Prorenin, please incubate sample over night at 37 °C and repeat measurement." |
| 5.3 Sample Preparation: | Important note added for the cause of values above the highest standard. |
| 6.2 Test Procedure: | In step 4 and 7 shaker speed changed to 400 rpm (old: 300-700 rpm). |
| 6.3.1 Example of Typical Standard Curve: | updated |
| 7 REFERENCE VALUES: | For the 2.5 th percentile and for the minimum value of the range, the value is updated to <2.5 pg/mL, according to section 9.3. |
| 9.3 Sensitivity: | updated, LoB (2.499 pg/mL) is now given as lowest value for the measuring range, instead of previous listed analytical sensitivity (0.80 pg/mL). |
| 10.2 Drug Interferences: | updated |
| 9.6 Method Comparison: | added |
| 12 LITERATURE: | addition of ref. # 14. |

Table of Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabella dei Contenuti / Tabla de Contenidos / Table des matières

| | | | | | |
|----|---|----|----|--|----|
| 1 | INTENDED USE | 4 | 8 | CONTROLLO DI QUALITÀ | 31 |
| 2 | PRINCIPLE OF THE TEST | 4 | 9 | CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI | 32 |
| 3 | WARNINGS AND PRECAUTIONS..... | 5 | 10 | LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA | 32 |
| 4 | MATERIALS | 6 | 11 | ASPETTI LEGALI | 33 |
| 5 | SAMPLE COLLECTION, STORAGE AND PREPARATION | 7 | 1 | FINALIDAD PREVISTA | 34 |
| 6 | ASSAY PROCEDURE | 8 | 2 | PRINCIPIO DEL TEST | 34 |
| 7 | REFERENCE VALUES | 10 | 3 | ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES..... | 34 |
| 8 | QUALITY CONTROL..... | 11 | 4 | MATERIAL..... | 35 |
| 9 | PERFORMANCE CHARACTERISTICS | 11 | 5 | TOMA DE LA MUESTRA, ALMACENAMIENTO Y PREPARACIÓN..... | 37 |
| 10 | LIMITATIONS OF THE PROCEDURE | 13 | 6 | PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO..... | 38 |
| 11 | LEGAL ASPECTS | 14 | 7 | VALORES DE REFERENCIA..... | 40 |
| 1 | ZWECKBESTIMMUNG | 15 | 8 | CONTROL DE CALIDAD..... | 40 |
| 2 | TESTPRINZIP | 15 | 9 | CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO | 41 |
| 3 | WARNUNGEN UND VORSICHTSMAßNAHMEN..... | 15 | 10 | LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO | 41 |
| 4 | MATERIALIEN..... | 16 | 11 | CUESTIONES LEGALES | 42 |
| 5 | ENTNAHME, LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER PROBEN | 19 | 1 | DESTINATION DU DISPOSITIF..... | 43 |
| 6 | TESTDURCHFÜHRUNG..... | 20 | 2 | PRINCIPE DU TEST | 43 |
| 7 | REFERENZWERTE | 22 | 3 | AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS..... | 43 |
| 8 | QUALITÄTSKONTROLLE | 23 | 4 | MATÉRIAUX..... | 44 |
| 9 | LEISTUNGSMERKMALE | 23 | 5 | PRÉLÈVEMENT, STOCKAGE ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS | 46 |
| 10 | GRENZEN DES VERFAHRENS | 23 | 6 | PROCÉDURE DE DOSAGE | 47 |
| 11 | RECHTLICHE GRUNDLAGEN..... | 24 | 7 | VALEURS DE RÉFÉRENCE..... | 49 |
| 1 | DESTINAZIONE D'USO | 25 | 8 | CONTRÔLE DE QUALITÉ | 49 |
| 2 | PRINCIPIO DEL TEST | 25 | 9 | CARACTERISTIQUES EN MATIERE DE PERFORMANCES | 50 |
| 3 | AVVERTENZE E PRECAUZIONI..... | 25 | 10 | LIMITES DE LA PROCÉDURE..... | 50 |
| 4 | MATERIALI..... | 26 | 11 | ASPECTS JURIDIQUES | 51 |
| 5 | PRELIEVO, CONSERVAZIONE E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI..... | 28 | 12 | LITERATURE | 52 |
| 6 | PROCEDURA DEL DOSAGGIO | 29 | | SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS... | 52 |
| 7 | VALORI DI RIFERIMENTO | 31 | | | |

1 INTENDED USE

The **DEMEDITEC Renin ELISA** is a manual enzyme immunoassay for the **quantitative** measurement of active Renin in human serum or EDTA plasma.

For *in vitro* diagnostic use. For laboratory professional use.

1.1 Scientific Validity Report

Renin is an enzyme (Mw of 37 kDa) that belongs to the aspartic acid protease family. Renin is a member of Renin-Angiotensin-Aldosterone System (RAAS) that controls blood pressure, renal blood flux, glomerular filtration, and sodium/potassium homeostasis. Renin is produced constitutively as prorenin, an inactive precursor with 386 amino acids, in the juxtaglomerular cells of the kidney (1). In response to low intra-renal blood pressure, reduced sodium reabsorption, hypokalemia or activity of the sympathetic nervous system, active renin can be released either from a depot in the kidney or generated from prorenin by cleavage of 46 amino acids at the N-terminus of prorenin (2,3). Prorenin secretion into the blood is continuous, in contrast to the tightly controlled release of renin, and blood concentration of prorenin is approx. 100-fold higher than active renin (4,5). After release and activation, soluble renin mediates cleavage of the α 2-globulin angiotensinogen into the precursor peptide angiotensin I, which ultimately is processed by angiotensin converting enzyme (ACE) to the octapeptide angiotensin II. All actions of angiotensin II are mediated by the G protein-coupled angiotensin type 1 (AT1) and angiotensin type 2 (AT2) receptors (6). Direct physiological effects of Angiotensin II include vasoconstriction, increase of tubular reabsorption of sodium and chloride, water retention, and release of the hormones aldosterone from adrenal cortex, antidiuretic hormone (ADH, Vasopressin) from posterior pituitary, and adrenocorticotrophic hormone (ACTH, Corticotropin) from anterior pituitary. Release of these hormones further supports sodium retention and secretion of potassium/H⁺ in the kidney, and increases thirst sensation and the desire for salt through the subfornical organ of the brain (7,8). In a negative feedback loop, renin secretion is reduced by high concentration of angiotensin II (9), and release of aldosterone is lowered by potassium depletion (10). Beside the action of soluble renin, binding of renin and prorenin to the membrane-bound renin receptor ATP6AP2 in brain, heart, placenta, liver, kidney and pancreas enhances efficiency of angiotensinogen cleavage and induces angiotensin-independent intra-cellular effects by activating mitogen activated kinases ERK1 and ERK2 (11). Besides the effects of the renin-angiotensin system (RAS) in the field of cardiovascular physiology as the main player in blood pressure homeostasis, other effects have since been described, and include proliferation, fibrosis, and inflammation (14).

Plasma renin is a good index for the activity of the RAAS. In case of dysfunction of the RAAS, the Renin assay will allow clinical implications for diagnosis, treatment, and follow up. Active renin should be measured in:

- Diagnosis of hypertension (high blood pressure: if diastolic blood pressure is > 90 mm Hg and systolic blood pressure is > 140 mm Hg; guideline of the European Society of Cardiology and the European Society of Hypertension)
- Differential diagnosis of hyperaldosteronism (primary hyperaldosteronism, secondary hyperaldosteronism with or without hypertension, pseudo-hyperaldosteronism)
- Diagnosis of isolated deficit in mineral corticoids
- Differential diagnosis of hypokalemia (secondary hyperaldosteronism or primary hypermineralcorticoism)
- Detection of Renin producing tumors in the kidney
- Monitoring of glucocorticoid therapy
- Diagnosis of insufficient response to antihypertensive treatment

2 PRINCIPLE OF THE TEST

The DEMEDITEC Renin ELISA is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on the **sandwich principle**. The microtiter wells are coated with a monoclonal antibody (mouse) directed towards a unique antigenic site of the human active Renin molecule. During the first incubation (together with assay buffer), Renin in the added sample binds to the immobilized antibody. After incubation, unbound components are washed off. The afterwards added enzyme conjugate, which contains monoclonal anti-Renin antibody conjugated to horseradish peroxidase, binds to the Renin forming a sandwich complex.

After a washing step to remove all unbound enzyme conjugate, the solid phase is incubated with the substrate solution. The colorimetric reaction is stopped by addition of stop solution, and optical density (OD) of the resulting yellow product is measured. The intensity of color is proportional to the concentration of the analyte in the sample. A standard curve is constructed by plotting OD values against concentrations of standards, and concentrations of unknown samples are determined using this standard curve.

3 WARNINGS AND PRECAUTIONS

- This kit is for *in vitro* diagnostic use only. For laboratory professional use only.
- Before starting the assay, read the instructions for use completely and carefully. Use the valid version of instructions for use provided with the kit. Be sure that everything is understood.
- Do not mix or use components from kits with different lot numbers. It is advised not to interchange wells of different plates even of the same lot. The kits may have been shipped or stored under different conditions and the binding characteristics of the plates may result slightly different.
- Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
- Do not reuse microtiter wells.
- Reagents of other manufacturers must not be used together with the reagents of this test kit.
- All reagents in this kit are clear liquids, substrate solution is clear and colorless. Changes in its appearance may affect the performance of the test. In that case, contact DEMEDITEC.
- Microbial contamination of reagents or samples may give false results.
- Allow the reagents to reach room temperature (20 °C to 26 °C) before starting the test. Temperature will affect the optical density readings of the assay.
- All indicated volumes must be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiter plate readers.
- Use reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing a substrate solution that had previously been used for the conjugate solution may turn solution coloured. Do not pour reagents back into original vials as reagent contamination may occur.

General precautions

- Follow laboratory quality assurance and laboratory safety guidelines.
- Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and samples with skin and mucous membranes.
- Do not smoke, eat, drink, or apply cosmetics in areas where samples or kit reagents are handled.
- Wear lab coats and disposable latex gloves when handling samples and reagents and where necessary safety glasses.

Biohazard information

- All reagents of this test kit which contain human serum or plasma have been tested and confirmed negative for HIV I/II, HBsAg and HCV by FDA approved procedures. However, no known test method can offer total assurance that no infectious agent is present.
- The device contains material of animal origin, which is certified apparently free of infectious or contagious diseases and injurious parasites.
- Bovine components originate from countries where BSE (Bovine spongiform encephalopathy) has not been reported.
- All materials and samples of human or animal origin must be handled as if capable of transmitting infectious diseases.
- Handling must be done in accordance with the procedures defined by appropriate national biohazard and safety guideline or regulation. Waste must be discarded according to local rules and regulations.

Information to chemical hazards and hazard classification

- Some reagents contain preservatives in non-declarable concentrations. Nevertheless, in case of contact with eyes or skin, flush immediately with water.
- Substrate Solution contains an ingredient in non-declarable concentrations which causes serious eye irritation. In case of possible contact with eyes, rinse immediately carefully and thoroughly with eye wash or water. After contact with skin, wash with plenty of water. Take-off contaminated clothing and wash it before reuse.

- Avoid contact with Stop Solution containing < 5 % H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns.
- Chemicals and prepared or used reagents must be treated as hazardous waste according to the national safety guideline or regulation.
- This product does not contain substances which have carcinogenic, mutagenic or toxic for reproduction (CMR) properties.

4 MATERIALS

4.1 Materials provided with the kit

1. **SORB MT Microtiterwells**, 12 x 8 wells (break apart), ready to use; Microtiter plate coated with anti-Renin antibody (monoclonal).
2. **CAL 0 – 5 LYO Standard (Standard 0-5)**, 6 x 1 mL, lyophilized; See “Reagent Preparation”, Standards*, concentrations: 0 – 4 – 16 – 32 – 64 – 128 pg/mL; Conversion: 1 pg/mL = 1.44 µIU/mL; *Calibrated against the following reference material: WHO 1st International Standard for Renin 68/356.*
3. **CONTROL low & high LYO Control Low & Control High**, 2 x 1 mL, lyophilized; See „Reagent Preparation“. Controls*; *For control values and ranges please refer to vial label or Certificate of Analysis.*
4. **BUF Assay Buffer**, 1 x 20 mL, ready to use; Assay Buffer*.
5. **ENZ CONJ Enzyme Conjugate**, 1 x 14 mL, ready to use; Enzyme Conjugate*, monoclonal anti-human Renin antibody conjugated to horseradish peroxidase.
6. **SUB TMB Substrate Solution**, 1 x 14 mL, ready to use; Substrate Solution, Contains 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB). *Keep away from direct sun light.*
7. **STOP SOLN Stop Solution**, 1 x 14 mL, ready to use; Stop Solution, contains < 5 % H₂SO₄, *avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.*
8. **WASH SOLN 40x Wash Solution**, 1 x 30 mL, See “Reagent Preparation”; Wash Solution, 40X concentrate.
9. 1x **Instructions for Use**; 1x **Certificate of Analysis (CoA)**

* Contains non-mercury preservative.

4.2 Materials required but not provided

- A calibrated microtiter plate reader (450 nm, with reference wavelength at 620 nm to 630 nm)
- Calibrated variable precision micropipettes
- Incubator for 37 °C
- Manual or automatic equipment for rinsing microtiter plate wells
- Absorbent paper
- Distilled water
- Timer
- Graph paper or software for data reduction
- Microplate shaker, 400 rpm

4.3 Storage and Stability of the Kit

Unopened kits and reagents as well as **opened reagents** must be stored at 2 °C to 8 °C.

The microplate must always be stored in the resealable aluminum pouch containing a desiccant. Do not open the pouch until it has reached room temperature. The microtiter plate consists of 12 individual strips. Each strip can be divided into 8 individual wells. Unused wells must be immediately returned to the aluminum pouch with the desiccant and stored again tightly resealed at 2 °C to 8 °C.

Once opened, reagent vials must be closed tightly again.

| | Storage Temperature | Stability |
|-------------------------------------|---------------------|--|
| Unopened kits and unopened reagents | 2 °C to 8 °C | Until the expiration date printed on the label. Do not use reagents beyond this date! |
| Opened kit | 2 °C to 8 °C | 8 weeks (For reconstituted reagents refer to “4.4 Reagent Preparation”.) |

4.4 Reagent Preparation

Bring all reagents and required number of strips to room temperature (20 °C to 26 °C) prior to use.

Standards

Reconstitute the lyophilized contents of each standard vial with 1 mL distilled water and let stand for at least 10 minutes at room temperature. Mix several times before use.

| | | |
|---------------------------------|-------------------------|-----------------|
| Stability after reconstitution: | at 2 °C to 8 °C | 14 days |
| | at -20 °C (in aliquots) | up to 12 months |

Controls

Reconstitute the lyophilized content of each control vial with 1 mL distilled water and let stand for at least 10 minutes at room temperature. Mix several times before use.

| | | |
|---------------------------------|-------------------------|-----------------|
| Stability after reconstitution: | at 2 °C to 8 °C | 14 days |
| | at -20 °C (in aliquots) | up to 12 months |

Wash Solution

Add distilled water to the 40X concentrated Wash Solution. Dilute 30 mL of concentrated *Wash Solution* with 1170 mL distilled water to a final volume of 1200 mL.

| | | |
|---------------------------|-------------------|--------|
| Stability after dilution: | at 20 °C to 26 °C | 1 week |
|---------------------------|-------------------|--------|

4.5 Disposal of the Kit

The disposal of the kit and all used materials/reagents must be performed according to the national regulations. Special information for this product is given in the Safety Data Sheet, section 13.

4.6 Damaged Test Kits

In case of any damage to the test kit or components, DEMEDITEC must be informed in writing, at the latest one week after receiving the kit. Damaged single components must not be used for a test run. They have to be stored until a final solution has been found. After this, they must be disposed of according to the official regulations.

5 SAMPLE COLLECTION, STORAGE AND PREPARATION

The following sample material can be used in this test:

Human serum or EDTA plasma

Samples containing sodium azide should not be used in the assay. In general, it should be avoided to use hemolytic, icteric, or lipemic samples. For further information, refer to chapter "*Interfering Substances*".

Conditions under which samples are collected must be carefully controlled, since a number of physiological factors can influence the renin secretion. These include:

- **Posture:** the patient must have been lying down for more than 1 hour or upright for more than 1 hour
- **Daily Renin oscillations:** sampling is to be done between 7 AM and 10 AM if possible.
- **Diet:** sodium content in the diet must be known and eventually verified by the measurement of natriuria over a period of 24 hours
- **Medication:** the level of active renin can be affected by antihypertensive medication (e.g. diuretics, ACE inhibitors, beta adrenergic blocking agents, vasodilators, renin inhibitors)
- **Pregnancy:** the level of inactive and active renin increases during pregnancy
- **Menstrual cycle:** the level of active renin increases on the second phase of the cycle (sampling is to be done if possible, during the first phase)
- **Age:** active renin level decreases with age

5.1 Sample Collection

Serum: Collect blood by venipuncture (e.g. Sarstedt Monovette for serum), allow to clot, and separate serum by centrifugation at room temperature. Do not centrifuge before complete clotting has occurred. Patients receiving anticoagulant therapy may require increased clotting time.

Plasma: Whole blood should be collected into centrifuge tubes containing anticoagulant (e.g. Sarstedt Monovette with the appropriate plasma preparation) and centrifuged immediately after collection.

Whole blood should not be frozen before centrifugation.

5.2 Samples Storage

Samples must be stored tightly capped prior to performing the assay. If stored frozen, freeze only once. Thawed samples must be inverted several times prior to testing.

| | | | |
|-----------|---------------------------|-----------------|--|
| Stability | at 2 °C to 8 °C | NOT stable | Store at room temperature and NOT at 2 °C to 8 °C prior to processing, since cryoactivation of prorenin may occur in the temperature range of 2 °C to 8 °C, giving false positive active renin values > 128 pg/mL (12,13, 14). To inactivate activated Prorenin, please incubate sample over night at 37 °C and repeat measurement. If samples cannot be tested <u>within 4 hours</u> of collection, store frozen. It is recommended to rapidly freeze, and thaw samples avoiding the temperature range of 2 °C to 8 °C. A dry ice/ethanol bath can be used for rapid freezing procedures. |
| | at room temperature | < 4 hours | |
| | at ≤ -20 °C (in aliquots) | up to 12 months | |

5.3 Sample Preparation

Samples can be assayed without additional preparation.

If in an initial assay, a sample is found to contain more analyte than the highest standard, the sample can be diluted with *Assay Buffer* and reassayed as described in the assay procedure.

Important note: values above highest standard (> 128 pg/mL) may be caused by:

1. very high concentrations of Renin (only in rare cases). In this case, please follow the instructions for dilution given below.
2. Cryoactivation of Prorenin to activated Prorenin due to inappropriate sample storage. In this case follow instruction given in chapter 5.2

If a dilution is required, the sample must be diluted at least 1:10 with *Assay Buffer*. For calculation of concentrations this dilution factor has to be taken into account.

Example:

- a) dilution 1:10: 20 µL sample + 180 µL *Assay Buffer* (mix thoroughly)
- b) dilution 1:20: 10 µL sample + 190 µL *Assay Buffer* (mix thoroughly).

6 ASSAY PROCEDURE

6.1 Procedural Notes

- All reagents and samples must be allowed to come to room temperature (20 °C to 26 °C) before use.
- All reagents must be mixed without foaming.
- Do not interchange caps of reagent vials to avoid cross-contamination.
- Use new disposal plastic pipette tips for each standard, control, or sample in order to avoid carry-over.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense conjugate without splashing accurately to the bottom of wells.
- Mix the contents of the microtiter plate wells thoroughly to ensure good test results.
- Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.
- Once the test has been started, all steps must be completed without interruption and in the same sequence for each step.
- The enzymatic reaction is linearly proportional to time and temperature.

- Optical density is a function of the incubation time and temperature. Respect the incubations times and temperatures as given in chapter “Test Procedure”.
- Before starting the assay, it is recommended that all reagents are ready, caps removed, all needed wells secured in holder, etc. This will ensure equal elapsed time for each pipetting step without interruption.
- **Important note to wash procedure:**
Washing is critical. Improperly washed wells will give erroneous results. The sensitivity and precision of this assay is markedly influenced by the correct performance of the washing procedure!
- **Test performance using fully automated analysis devices:**
Automated test performance using fully automated, open-system analysis devices is possible. However, the combination must be validated by the user.

6.2 Test Procedure

Each run must include a standard curve. The controls serve as internal controls for the reliability of the test procedure. They must be assayed with each test run. The given test procedure describes manual processing.

Important note: The accuracy of this assay is markedly influenced by the correct incubation temperature, incubation time, and correct pipetting volumes.

1. Secure the desired number of microtiter wells in the frame holder.
2. Pipette **150 µL** of **Assay Buffer** in all appropriate wells.
3. Pipette **50 µL** of each **Standard, Control,** and **sample** with new disposable tips into appropriate wells.
Thoroughly mix for 10 seconds. It is important to have a complete mixing in this step.
4. Incubate for **90 minutes** at room temperature on a plate shaker with 400 rpm.
5. Wash the wells as follows:
If the wash step is performed manually:
 Briskly shake out the contents of the wells.
 Rinse the wells **4 times** with **300 µL** diluted *Wash Solution* per well.
If an automated plate washer is used:
 Rinse the wells **4 times** with **400 µL** diluted *Wash Solution* per well. .
At the end of the washing step, always strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets!
6. Add **100 µL Enzyme Conjugate** into each well.
7. Incubate for **90 minutes** at room temperature on a plate shaker with 400 rpm.
8. Wash as described in step 5.
9. Pipette **100 µL** of **Substrate Solution** to each well.
10. Incubate for **15 minutes** at room temperature.
11. Stop the enzymatic reaction by adding **100 µL** of **Stop Solution** to each well.
12. Measure the optical density (OD) of the solution in each well at **450 nm (reading) and at 620 nm to 630 nm (background subtraction, recommended)** with a microtiter plate reader.
It is recommended that the wells be read **within 10 minutes** after adding the *Stop Solution*.

6.3 Calculation of Results

1. The concentration of the samples can be read directly from the standard curve.
2. For duplicate determinations, the mean of the two optical density (OD) values for each standard, control, and patient sample must be taken. If the two values deviate substantially from one another, DEMEDITEC recommends retesting the samples.
3. Samples with concentrations exceeding the highest standard can be further diluted with *Assay Buffer* and re-assayed as described in "Test Procedure", or must be reported as > 128 pg/mL. For the calculation of the concentrations, this dilution factor must be considered.
4. Automated method:
The results in the instructions for use have been calculated automatically using a four-parameter logistic (4PL) curve fit. (4PL Rodbard or 4PL Marquardt are the preferred methods.) Other data reduction functions may give slightly different results.
5. Manual method:
Using linear graph paper, construct a standard curve by plotting the (mean) OD obtained from each standard against its concentration with OD value on the vertical (Y) axis and concentration on the horizontal (X) axis.
Determine the corresponding sample concentration from the standard curve by using the (mean) OD value for each sample.

6.3.1 Example of Typical Standard Curve

The following data is for demonstration only and **cannot** be used in place of data generations at the time of assay.

| Standard | Optical Density (450 nm) |
|------------------------|--------------------------|
| Standard 0 (0 pg/mL) | 0.170 |
| Standard 1 (4 pg/mL) | 0.284 |
| Standard 2 (16 pg/mL) | 0.544 |
| Standard 3 (32 pg/mL) | 0.885 |
| Standard 4 (64 pg/mL) | 1.573 |
| Standard 5 (128 pg/mL) | 2.586 |

7 REFERENCE VALUES

It is strongly recommended that each laboratory determine its own reference values.

In a study conducted with apparently normal healthy adults, using the DEMEDITEC Renin ELISA the following values are observed in EDTA plasma:

| Healthy Adults | n | Mean (pg/mL) | Median (pg/mL) | 2.5 th - 97.5 th Percentile (pg/mL) | Range (min. - max.) (pg/mL) |
|------------------|----|--------------|----------------|---|-----------------------------|
| Supine position | 59 | 16.23 | 12.40 | < 2.50 – 53.83 | < 2.50 – 58.78 |
| Upright position | 59 | 19.73 | 16.18 | 2.79 – 61.83 | < 2.50 – 95.56 |

These values are also valid for serum.

In a study conducted with apparently normal healthy adults, using the DEMEDITEC Aldosterone ELISA (DE5298) and the DEMEDITEC Renin ELISA the following **Aldosterone-Renin Ratios** were determined in EDTA plasma:

Ratio Aldosterone Renin (pg/mL / pg/mL)

| | n | Mean | Median | 2.5 th - 97.5 th Percentile |
|----------------|----|------|--------|---|
| Healthy Adults | 89 | 8.68 | 5.30 | 0.52 – 37.83 |

These values are also valid for serum.

Values above or below the reference range should be considered as suspicious and require additional testing. The results alone should not be the only reason for any therapeutic consequences. The results must be correlated to other clinical observations and diagnostic tests.

8 QUALITY CONTROL

Good quality assurance in the laboratory requires that controls be run with each calibration curve. A statistically significant number of controls should be assayed to establish mean values and acceptable ranges to assure proper performance. It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day-to-day validity of results. Use controls at both normal and pathological levels. The controls and the corresponding results of the Quality Control Laboratory are stated in the Certificate of Analyses (CoA) added to the kit. The values and ranges stated on the CoA always refer to the current kit lot and must be used for direct comparison of the results. If available, it is also recommended to make use of national or international Quality Assessment programs in order to ensure the accuracy of the results. Apply appropriate statistical methods for analyzing control values and trends. If the results of the assay do not agree with the established acceptable ranges of control materials, patient results should be considered invalid. In this case, please check the following technical areas: Pipetting and timing devices; photometer, expiration dates of reagents, storage and incubation conditions, aspiration and washing methods. After checking the above-mentioned items without finding any error contact your distributor or DEMEDITEC directly.

9 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

9.1 Specificity of Antibodies (Cross-Reactivity)

The following substances were tested for cross-reactivity of the assay:

| Substance | Added concentration | Mean Cross-Reactivity (%) |
|---------------------|---------------------|---------------------------|
| Hepcidin | 140 ng/mL | < 0.001 |
| Pepsin | 50 µg/mL | < 0.001 |
| Human serum albumin | 1.2 mg/mL | < 0.001 |
| Human IgG | 1.0 mg/mL | < 0.001 |

Mean cross reactivity with Prorenin was 0.71% (mean value when prorenin was spiked in a concentration range from 256 pg/mL to 4096 pg/mL). However, the observed cross reactivity may only represent a contamination of the recombinant prorenin preparation with active renin due to auto-activation.

9.2 Sensitivity

| | |
|-------------------------------|-------------------------|
| Limit of Blank (LoB) | 2.499 pg/mL |
| Limit of Detection (LoD) | 4.308 pg/mL |
| Limit of Quantification (LoQ) | 6.021 pg/mL |
| Measuring range | 2.499 pg/mL – 128 pg/mL |
| Linear range | 2.850 pg/mL – 128 pg/mL |

9.3 Reproducibility

9.3.1 Within-run Precision

The within-run precision was determined with patient samples covering the complete measuring range within 20 days in 2 independent runs per day. CV was calculated as mean CV of 40 runs.

| Sample | n | Mean (pg/mL) | CV (%) |
|--------|----|--------------|--------|
| 1 | 40 | 106.03 | 1.5 |
| 2 | 40 | 71.01 | 1.5 |
| 3 | 40 | 48.52 | 2.0 |
| 4 | 40 | 30.13 | 2.4 |
| 5 | 40 | 20.27 | 1.9 |
| 6 | 40 | 10.62 | 4.8 |

9.3.2 Between-run Precision

The between-run precision was determined with patient samples covering the complete measuring range within 20 days in 2 independent runs per day and with 2 replicates per run (20 x 2 x 2). CV was calculated from 80 determinations.

| Sample | n | Mean (pg/mL) | CV (%) |
|--------|----|--------------|--------|
| 1 | 80 | 106.03 | 2.5 |
| 2 | 80 | 71.01 | 2.1 |
| 3 | 80 | 48.52 | 2.8 |
| 4 | 80 | 30.13 | 3.6 |
| 5 | 80 | 20.27 | 4.1 |
| 6 | 80 | 10.62 | 6.9 |

9.3.3 Between-lot Precision

The between-lot variation was determined by 6 measurements of different samples with 3 different kit lots.

| Sample | n | Mean (pg/mL) | CV (%) |
|--------|----|--------------|--------|
| 1 | 18 | 101.72 | 1.2 |
| 2 | 18 | 71.46 | 1.7 |
| 3 | 18 | 49.32 | 2.0 |
| 4 | 18 | 27.65 | 1.2 |
| 5 | 18 | 18.98 | 1.5 |
| 6 | 18 | 10.09 | 5.5 |

9.4 Recovery

Recovery was determined by adding increasing amounts of the analyte to different patient samples containing different amounts of endogenous analyte. The percentage recoveries were determined by comparing expected and measured values of the samples.

| | Sample 1 | Sample 2 | Sample 3 | Sample 4 |
|------------------------------|-------------|----------|----------|----------|
| Concentration (pg/mL) | 8.93 | 15.97 | 55.27 | 100.61 |
| Average Recovery (%) | 100.2 | 96.0 | 108.4 | 99.0 |
| Range of Recovery (%) | from | 95.5 | 86.8 | 106.2 |
| | to | 103.3 | 105.3 | 111.9 |

9.5 Linearity

Samples containing different amounts of analyte were serially diluted with *Assay Buffer*. The percentage recovery was calculated by comparing the expected and measured values for the analyte.

| | Sample 1 | Sample 2 | Sample 3 | Sample 4 |
|------------------------------|-------------|----------|----------|----------|
| Concentration (pg/mL) | 45.16 | 53.20 | 67.35 | 126.02 |
| Average Recovery (%) | 101.7 | 102.8 | 110.0 | 98.5 |
| Range of Recovery (%) | from | 96.7 | 95.6 | 105.0 |
| | to | 108.6 | 114.6 | 114.6 |
| | | 100.8 | | |

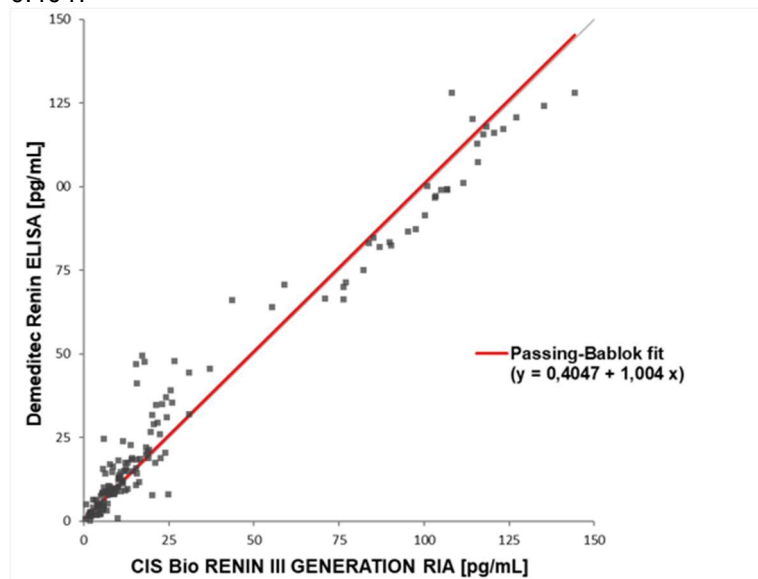
9.6 Method Comparison

A comparison of DEMEDITEC Renin ELISA (DE5125) (y) and the reference method (x) (radioimmunoassay RENIN III GENERATION, Cisbio Bioassays) using clinical samples gave the following correlation:

$$n = 151$$

$$r = 0.979$$

$$y = 1.004x + 0.4047$$



10 LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Reliable and reproducible results will be obtained when the assay procedure is performed with a complete understanding of the instructions for use and in compliance with the laboratory quality assurance guidelines. Any improper handling of samples or modification of this test might influence the results.

10.1 Interfering Substances

Hemoglobin (up to 4 mg/mL), bilirubin (up to 0.5 mg/mL) and triglyceride (up to 30 mg/mL) have no influence on the assay results.

10.2 Drug Interferences

| Substance | Concentration Range of Spiked Substance | Mean Recovery (%) |
|-------------------------|---|-------------------|
| Aliskiren | 10 – 100 µg/mL | 139.9 |
| Captopril | 0.5 – 5 µg/mL | 102.4 |
| Furosemid | 6 – 60 µg/mL | 95.4 |
| Enalapril maleate | 0.05 – 0.5 µg/mL | 102.4 |
| Nicardipin-hydrochlorid | 5 – 50 µg/mL | 96.1 |
| Cathepsin D | 0.05 – 0.5 U/mL | 101.5 |
| Cathepsin D | 0.01 – 0.1 U/mL | 98.6 |

In addition, the level of active renin in plasma may be affected by antihypertensive medication (e.g. diuretics, ACE inhibitors, beta adrenergic blocking agents, or vasodilators)

10.3 High-Dose Hook Effect

"High-Dose Hook Effect" is not detected up to 8200 pg/mL of Renin.

11 LEGAL ASPECTS

11.1 Reliability of Results

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover, the user must strictly adhere to the laboratory quality assurance guidelines and applicable national standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test.

The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications. If there is any doubt or concern regarding a result, please contact DEMEDITEC.

11.2 Therapeutic Consequences

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as stated under point 11.1. Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of a patient. Only in cases where the laboratory results are in acceptable agreement with the overall clinical picture of the patient should therapeutic consequences be derived. The test result itself should never be the sole determinant for deriving any therapeutic consequences.

11.3 Liability

Any modification of the test kit and/or exchange or mixture of any components of different lots from one test kit to another could negatively affect the intended results and validity of the overall test. Such modification and/or exchanges invalidate any claim for replacement. Claims submitted due to customer misinterpretation of laboratory results subject to point 11.2 are also invalid. Regardless, in the event of any claim, the manufacturer's liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the test kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.

11.4 Reporting of Serious Incident

Any serious incident that has occurred in relation to the device shall be reported to the manufacturer and the competent authority of the Member State in which the user and/or the patient is established.

1 ZWECKBESTIMMUNG

Der **DEMEDITEC Renin ELISA** ist ein manueller Enzymimmunoassay zur **quantitativen** Messung von aktivem Renin in humanem Serum oder EDTA-Plasma.

Für den Einsatz in der *In-vitro* Diagnostik. Für den beruflichen Gebrauch in Laboratorien.

Weitere Informationen zur bestimmungsgemäßen Verwendung finden Sie in der englischen Version der Gebrauchsanweisung.

2 TESTPRINZIP

Der DEMEDITEC Renin ELISA ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay, der auf der **Sandwichtechnik** basiert. Die Wells der Mikrotiterplatten sind mit einem monoklonalen Antikörper (Maus) beschichtet, der gegen eine definierte Antikörper-Bindungsstelle des aktiven Renin-Moleküls gerichtet ist. Während der ersten Inkubation (zusammen mit Assaypuffer) bindet das Renin-Molekül in der zugegebenen Probe an den immobilisierten Antikörper. Nach der Inkubation werden die ungebundenen Bestandteile abgewaschen. Die Konjugatlösung, die anschließend zugegeben wird und einen an Meerrettichperoxidase konjugierten monoklonalen Renin-Antikörper enthält, bindet an Renin unter Bildung eines Sandwich-Komplexes. Nach einem Waschschrift, um ungebundenes Enzymkonjugat zu entfernen, wird die feste Phase mit der Substratlösung inkubiert. Die Farbreaktion wird durch die Zugabe der Stopplösung beendet und die optische Dichte (OD) des resultierenden gelben Produktes gemessen. Die Intensität der Farbe ist proportional zur Konzentration des Analyten in der Probe. Durch Auftragen der OD-Werte gegen die Konzentrationen der Standards wird eine Standardkurve erstellt, und die Konzentrationen der unbekanntenen Proben werden anhand dieser Standardkurve bestimmt.

3 WARNUNGEN UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- Dieser Kit ist nur für den Einsatz in der In-vitro Diagnostik bestimmt. Nur für den professionellen Gebrauch in Laboratorien.
- Bevor Sie mit dem Test beginnen, lesen Sie die Gebrauchsanweisung vollständig und sorgfältig durch. Verwenden Sie nur die gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung. Stellen Sie sicher, dass Sie alles verstanden haben.
- Komponenten aus Kits mit unterschiedlichen Chargennummern dürfen nicht gemischt oder zusammen verwendet werden. Vertiefungen verschiedener Platten, auch aus derselben Charge, sollten nicht untereinander ausgetauscht werden. Die Kits können unter unterschiedlichen Bedingungen transportiert oder gelagert worden sein, so dass die Bindungscharakteristik der Platten leichte Unterschiede aufweisen kann.
- Reagenzien nicht über das auf den Kit-Etiketten angegebene Verfallsdatum hinaus verwenden.
- Mikrotitervertiefungen nicht wiederverwenden.
- Reagenzien anderer Hersteller dürfen nicht zusammen mit den Reagenzien dieses Testkits verwendet werden.
- Alle Reagenzien dieses Kits sind klare Lösungen, die Substratlösung ist klar und farblos. Veränderungen des Aussehens können die Durchführung des Tests beeinträchtigen. In diesem Fall wenden Sie sich bitte an DEMEDITEC.
- Eine mikrobielle Kontamination von Reagenzien oder Proben kann zu falschen Ergebnissen führen.
- Lassen Sie die Reagenzien vor Testbeginn Raumtemperatur (20 °C bis 26 °C) erreichen. Die Temperatur wirkt sich auf die Messungen der optischen Dichte des Assays aus.
- Alle im Kit-Protokoll angegebenen Volumina müssen genau eingehalten werden. Optimale Ergebnisse können nur durch Verwendung kalibrierter Pipetten und Mikrotiterplatten-Lesegeräte erreicht werden.
- Behältnisse jeweils nur für ein einziges Reagenz verwenden. Dies gilt insbesondere für die Substrat-Behälter. Die Verwendung eines Behälters zum Pipettieren der Substratlösung, der zuvor für die Konjugatlösung verwendet wurde, kann zu einer Verfärbung der Lösung führen. Geben Sie keine Reagenzien zurück in die Originalfläschchen, da es zu einer Kontamination der Reagenzien kommen kann.

Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen

- Befolgen Sie die Richtlinien zur Qualitätssicherung und zur Sicherheit im Labor.
- Niemals mit dem Mund pipettieren und den Kontakt von Reagenzien und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.

- In Bereichen, in denen mit Kitbestandteilen oder Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen, trinken oder Kosmetika verwenden.
- Beim Umgang mit Proben und Reagenzien sind Laborkittel und Einweg-Latexhandschuhe sowie, falls erforderlich, eine Schutzbrille zu tragen.

Informationen zur biologischen Gefährdung

- Alle Bestandteile dieses Testkits, die humanes Serum oder Plasma enthalten, wurden mit FDA-geprüften Methoden auf HIV I/II, HbsAg und HCV getestet und als negativ bestätigt. Kein bekanntes Testverfahren kann jedoch mit absoluter Sicherheit ausschließen, dass kein Infektionserreger vorhanden ist.
- Das Produkt enthält Material tierischen Ursprungs, das nachweislich frei von infektiösen oder ansteckenden Krankheiten und schädigenden Parasiten ist.
- Komponenten von Rindern stammen aus Ländern, in denen keine BSE (Bovine Spongiforme Enzephalopathie) gemeldet wurde.
- Alle Materialien und Proben menschlichen oder tierischen Ursprungs müssen so behandelt werden, als ob sie ansteckende Krankheiten übertragen könnten.
- Die Handhabung muss in Übereinstimmung mit den Verfahren erfolgen, die in den entsprechenden nationalen Richtlinien oder Vorschriften für Biogefährdung und Sicherheit festgelegt sind. Abfälle müssen gemäß den lokalen Regeln und Vorschriften entsorgt werden.

Informationen zu chemischen Gefahren und zur Gefahreinstufung

- Einige Reagenzien enthalten Konservierungsmittel in nicht kennzeichnungspflichtiger Konzentrationen. Bei Kontakt der Reagenzien mit den Augen oder der Haut dennoch sofort mit ausreichend Wasser spülen.
- Die Substratlösung enthält einen Inhaltsstoff in nicht kennzeichnungspflichtiger Konzentration, der schwere Augenreizungen verursacht. Bei möglichem Kontakt mit den Augen sofort sorgfältig und gründlich mit Augenspülung oder Wasser spülen. Bei Berührung mit der Haut mit reichlich Wasser abwaschen. Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor Wiederverwendung waschen.
- Kontakt mit der Stopplösung (*Stop Solution*) vermeiden, da sie < 5% H₂SO₄ enthält. Schwefelsäure kann Hautreizungen und -verätzungen verursachen.
- Chemikalien und zubereitete oder gebrauchte Reagenzien müssen als gefährlicher Abfall gemäß den nationalen Sicherheitsrichtlinien oder -vorschriften behandelt werden.
- Dieses Produkt enthält keine Stoffe, die krebserregende, erbgutverändernde oder fortpflanzungsgefährdende Eigenschaften (CMR) haben.

4 MATERIALIEN

4.1 Im Kit mitgelieferte Materialien

1. **SORB MT Microtiterwells**, 12 x 8 Wells (einzeln brechbar), gebrauchsfertig; Mikrotiterplatte, mit anti-Renin Antikörper (monoklonal) beschichtet.
2. **CAL 0 – 5 LYO Standard (Standard 0-5)**, 6 x 1 mL, lyophilisiert, *siehe „Vorbereitung der Reagenzien“*; Standards*, Konzentrationen: 0 – 4 – 16 – 32 – 64 – 128 pg/mL; Umrechnungsfaktor: 1 pg/mL = 1,44 µIU/mL; Kalibriert gegen folgendes Referenzmaterial: *WHO 1st International Standard for Renin 68/356*.
3. **CONTROL low & high LYO Control Low & High** 2 x 1 mL, lyophilisiert, *siehe „Vorbereitung der Reagenzien“*; Kontrollen*, *Kontrollwerte und -bereiche entnehmen Sie bitte dem Fläschchenetikett oder dem CoA*.
4. **BUF Assay Buffer** 1 x 20 mL, gebrauchsfertig; Assaypuffer*.
5. **ENZ CONJ Enzyme Conjugate** 1 x 14 mL, gebrauchsfertig; Enzymkonjugat*, monoklonaler anti-humaner Renin-Antikörper mit Meerrettichperoxidase konjugiert.
6. **SUB TMB Substrate Solution** 1 x 14 mL, gebrauchsfertig; Substratlösung*, enthält 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB). *Von direktem Sonnenlicht fernhalten*.
7. **STOP SOLN Stop Solution** 1 x 14 mL, gebrauchsfertig; Stopplösung*, enthält < 5 % H₂SO₄. *Kontakt mit der Stopplösung vermeiden! Kann Hautreizungen und -verätzungen verursachen*.
8. **WASH SOLN 40x Wash Solution** 1 x 30 mL, *siehe „Vorbereitung der Reagenzien“*; Waschlösung, 40X-Konzentrat*.
9. 1x **Gebrauchsanweisung (IFU)**; 1x **Analysenzertifikat (CoA)**

* Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.

4.2 Erforderliche, aber nicht enthaltene Materialien

- Kalibriertes Mikrotiterplattenlesegerät (450 nm, mit Referenzwellenlänge bei 620 nm bis 630 nm)
- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipetten
- Inkubator für 37 °C
- Manuelle oder automatische Waschvorrichtung für Mikrotiterplatten
- Saugfähiges Papier
- Destilliertes Wasser
- Laborwecker
- Millimeterpapier oder Software zur Datenauswertung
- Mikrotiterplatten-Schüttler (400 Upm)

4.3 Lagerung und Haltbarkeit des Kits

Ungeöffnete Kits und Reagenzien sowie **geöffnete Reagenzien** müssen bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden. Die Mikrotiterplatte muss immer in dem wiederverschließbaren Aluminiumbeutel, der ein Trockenmittel enthält, gelagert werden. Öffnen Sie den Beutel erst, wenn er Raumtemperatur erreicht hat. Die Mikrotiterplatte besteht aus 12 einzelnen Streifen. Jeder Streifen kann in 8 einzelne Kavitäten (Wells) unterteilt werden. Nicht benötigte Kavitäten müssen sofort in den Aluminiumbeutel mit dem Trockenmittel zurückgegeben und wieder dicht verschlossen bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden. Einmal geöffnete Reagenzfläschchen müssen wieder fest verschlossen werden.

| | Lagerungstemperatur | Stabilität |
|---|---------------------|--|
| Ungeöffneter Kit und ungeöffnete Reagenzien | 2 °C bis 8 °C | Bis zu dem auf dem Etikett aufgedruckten Verfallsdatum. Reagenzien nach Ablauf dieses Datums nicht mehr verwenden! |
| Geöffneter Kit | 2 °C bis 8 °C | 8 Wochen (Für rekonstituierte Reagenzien siehe "4.4 Vorbereitung der Reagenzien".) |

4.4 Vorbereitung der Reagenzien

Alle Reagenzien und die benötigte Anzahl der Mikrotiterstreifen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur (20 °C bis 26 °C) bringen.

Standards

Das Lyophilisat in jedem Standard-Fläschchen mit 1 mL destilliertem Wasser auflösen und mindestens 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen. Vor der Verwendung mehrere Male mischen.

| | | |
|---------------------------------|---------------------------|------------------|
| Stabilität nach Rekonstitution: | bei 2 °C bis 8 °C | 14 Tage |
| | bei -20 °C (in Aliquoten) | bis zu 12 Monate |

Control

Das Lyophilisat in jedem Kontroll-Fläschchen mit 1 mL destilliertem Wasser auflösen und mindestens 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen. Vor der Verwendung mehrere Male mischen.

| | | |
|---------------------------------|---------------------------|------------------|
| Stabilität nach Rekonstitution: | bei 2 °C bis 8 °C | 14 Tage |
| | bei -20 °C (in Aliquoten) | bis zu 12 Monate |

Wash Solution

Fügen Sie der 40-fach konzentrierten Waschlösung (*Wash Solution*) destilliertes Wasser hinzu. 30 mL der konzentrierten Waschlösung mit 1170 mL destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 1200 mL verdünnen.

| | | |
|-----------------------------|---------------------|---------|
| Stabilität nach Verdünnung: | bei 20 °C bis 26 °C | 1 Woche |
|-----------------------------|---------------------|---------|

4.5 Entsorgung des Kits

Die Entsorgung des Kits und aller verwendeten Materialien / Reagenzien muss gemäß den nationalen gesetzlichen Vorschriften erfolgen. Spezielle Informationen für dieses Produkt finden Sie im Sicherheitsdatenblatt, Abschnitt 13.

4.6 Beschädigte Testkits

Im Falle einer Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss die Firma DEMEDITEC in schriftlicher Form spätestens eine Woche nach Erhalt des Kits informiert werden. Beschädigte Einzelkomponenten dürfen nicht für den Testlauf verwendet werden. Sie müssen aufbewahrt werden, bis eine endgültige Lösung gefunden wurde. Danach sollten Sie gemäß den offiziellen Richtlinien entsorgt werden.

5 ENTNAHME, LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER PROBEN

Das folgende Probenmaterial kann in diesem Test eingesetzt werden:

Humanes Serum oder EDTA-Plasma

Proben, die Natriumazid enthalten, sollten nicht verwendet werden. Generell sollte die Verwendung von hämolytischen, ikterischen oder lipämischen Proben vermieden werden. Weitere Informationen finden Sie im Kapitel „*Interferenzen*“.

Die Entnahme der Proben muss unter definierten Bedingungen stattfinden, da die Reninkonzentration unter anderem durch folgende Faktoren beeinflusst wird:

- Lage des Patienten: der Patient sollte mehr als eine Stunde entweder in liegender oder stehender Position verbracht haben
- Tageszeitliche Schwankungen der Reninkonzentration: die Probenentnahme sollte wenn möglich immer in der Zeit von 7:00-10:00 Uhr vormittags stattfinden.
- Ernährung: der Natriumgehalt der Nahrung sollte bekannt sein und gegebenenfalls durch die Bestimmung einer Natriurie über einen zeitlichen Verlauf von 24 Stunden bestimmt werden
- Medikamentierung: die Reninwerte können durch Gabe von Antihypertonika beeinflusst werden (z.B. Diuretika, ACE Inhibitoren, Beta-Blocker oder Vasodilatoren, Renin-Inhibitoren)
- Schwangerschaft: die Konzentration an aktivem und inaktivem Renin steigt im Verlauf der Schwangerschaft an
- Menstruationszyklus: die Reninwerte steigen im Verlauf der 2. Phase des Zyklus an; die Probenentnahme sollte deshalb wenn möglich in der 1. Phase des Zyklus erfolgen
- Alter: die Reninwerte nehmen mit zunehmendem Alter ab.

5.1 Probenentnahme

Serum: Blut durch Venenpunktion entnehmen (z.B. mit Sarstedt Monovette für Serum), gerinnen lassen und das Serum durch Zentrifugation bei Raumtemperatur abtrennen. Vor der Zentrifugation muss die Gerinnung vollständig abgeschlossen sein. Bei Patienten, die Antikoagulantien erhalten, kann die Gerinnungszeit länger dauern.

Plasma: Die Blutentnahme erfolgt mit Röhren, die ein Antikoagulant enthalten (z.B.: Sarstedt Monovette – mit entsprechender Plasma-Präparierung). Das Plasma wird als Überstand nach einer Zentrifugation gewonnen.

Vollblut sollte vor der Zentrifugation nicht eingefroren werden.

5.2 Probenlagerung

Die Proben müssen bis zur Durchführung des Tests fest verschlossen aufbewahrt werden. Wenn sie gefroren gelagert werden, nur einmal einfrieren. Aufgetaute Proben müssen vor dem Test mehrmals geschwenkt werden.

| | | | |
|------------|-----------------------------|------------------|---|
| Stabilität | bei 2 °C bis 8 °C | NICHT stabil | Vor der Verarbeitung bei Raumtemperatur lagern und NICHT bei 2 °C bis 8 °C, da es im Temperaturbereich von 2 °C bis 8 °C zur Kryoaktivierung von Prorenin kommen kann, was zu falsch-positiven aktiven Reninwerten > 128 pg/mL führt (12,13, 14). Um aktiviertes Prorenin zu inaktivieren, inkubieren Sie die Probe über Nacht bei 37 °C und wiederholen die Messung. Wenn die Proben nicht <u>innerhalb von 4 Stunden</u> nach der Entnahme getestet werden können, müssen sie eingefroren gelagert werden. Es wird empfohlen, die Proben schnell einzufrieren und aufzutauen, wobei ein Temperaturbereich von 2 °C bis 8 °C zu vermeiden ist. Für das schnelle Einfrieren kann ein Trockeneis-/Ethanolbad verwendet werden. |
| | bei Raumtemperatur | < 4 Stunden | |
| | bei ≤ -20 °C (in Aliquoten) | bis zu 12 Monate | |

5.3 Probenvorbereitung

Die Proben können ohne zusätzliche Vorbereitung analysiert werden. Wenn im ersten Testdurchlauf festgestellt wird, dass eine Probe mehr Analyt enthält als der höchste Standard, kann diese Probe mit *Assay Buffer* weiter verdünnt und wie im Testverfahren beschrieben erneut getestet werden.

Wichtiger Hinweis: Werte über dem höchsten Standard (> 128 pg/mL) können verursacht werden durch:

1. sehr hohe Konzentrationen von Renin (nur in seltenen Fällen). In diesem Fall befolgen Sie bitte die unten stehenden Empfehlungen zur Verdünnung.
2. Kryoaktivierung von Prorenin zu aktiviertem Prorenin aufgrund unsachgemäßer Probenlagerung. In diesem Fall befolgen Sie bitte die Anweisungen in Kapitel 5.2.

Wenn eine Verdünnung erforderlich ist, muss die Probe mindestens 1:10 mit *Assay Buffer* verdünnt werden. Die Verdünnung muss bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

Beispiel:

- a) Verdünnung 1:10: 20 μ L Probe + 180 μ L *Assay Buffer*; Sorgfältig mischen.
- b) Verdünnung 1:20: 10 μ L Probe + 190 μ L *Assay Buffer*; Sorgfältig mischen.

6 TESTDURCHFÜHRUNG

6.1 Hinweise zur Durchführung

- Alle Reagenzien und Proben müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20 °C bis 26 °C) gebracht werden.
- Alle Reagenzien müssen ohne Schaumbildung gemischt werden.
- Die Kappen der Reagenzfläschchen dürfen nicht vertauscht werden, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.
- Für jeden Standard, jede Kontrolle oder Probe eine neue Einweg-Plastikspitze verwenden, um Verschleppungen zu vermeiden.
- Mischen Sie den Inhalt der Mikrotiterplatten-Vertiefungen gründlich, um gute Testergebnisse zu gewährleisten.
- Kavitäten während der Testdurchführung nicht trocknen lassen; Reagenzien unmittelbar nach Ende des Waschschriffs hinzufügen.
- Sobald der Test begonnen wurde, müssen alle Schritte ohne Unterbrechung und in der gleichen Reihenfolge für jeden Schritt abgeschlossen werden.
- Die enzymatische Reaktion ist linear proportional zu Zeit und Temperatur.
- Die optische Dichte ist eine Funktion der Inkubationszeit und -temperatur. Die in Kapitel "Testverfahren" angegebenen Inkubationszeiten und -temperaturen müssen eingehalten werden.
- Es wird empfohlen, vor Beginn der Testdurchführung alle Reagenzien in einen arbeitsbereiten Zustand zu bringen, die Deckel der Fläschchen zu öffnen, alle benötigten Wells in den Halter zu setzen, usw. Nur eine solche Vorbereitung garantiert für jeden Pipettierschritt gleiche Zeiten ohne Unterbrechung.
- **Wichtiger Hinweis zum Waschvorgang:**
Das Waschen ist entscheidend. Unsachgemäß gewaschene Kavitäten führen zu fehlerhaften Ergebnissen. Die Sensitivität und Präzision dieses Assays wird erheblich beeinflusst von der korrekten Durchführung des Waschschriffs!
- **Testdurchführung mit vollautomatischen Analysegeräten:**
Eine automatisierte Testdurchführung mit vollautomatischen, systemoffenen Analysegeräten ist möglich. Die Kombination muss jedoch vom Anwender validiert werden.

6.2 Testdurchführung

Jeder Lauf muss eine Standardkurve beinhalten. Die Kontrollen dienen der internen Überprüfung der Zuverlässigkeit des Testverfahrens. Sie müssen bei jedem Testdurchlauf gemessen werden. Das angegebene Testverfahren beschreibt die manuelle Abarbeitung.

Wichtiger Hinweis: Die Genauigkeit dieses Tests wird maßgeblich durch die korrekte Inkubationstemperatur, Inkubationszeit und das korrekte Pipettiervolumen beeinflusst!

1. Die benötigte Anzahl der Mikrotiter-Wells in der Halterung befestigen.
2. **150 µL Assay Buffer** in die entsprechenden Wells pipettieren.
3. **Je 50 µL Standard, Control und Probe** mit neuen Plastikspitzen in die entsprechenden Wells pipettieren.
Für 10 Sekunden gut schütteln. Es ist sehr wichtig, in diesem Schritt eine komplette Durchmischung zu erreichen.
4. **90 Minuten** bei Raumtemperatur auf einem Schüttler mit 400 U/min inkubieren.
5. Die Vertiefungen folgendermaßen waschen:
Wenn der Waschschrift manuell durchgeführt wird:
Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln.
Wells **4-mal** mit **300 µL** verdünnter *Wash Solution* pro Well waschen.
Bei Verwendung eines Waschautomaten:
Wells **4-mal** mit **400 µL** verdünnter *Wash Solution* pro Well waschen.
Am Ende des Waschschrifts die Vertiefungen immer kräftig auf saugfähigem Papier ausklopfen, um verbliebene Flüssigkeit zu entfernen.
6. **100 µL Enzyme Conjugate** in jedes Well zugeben.
7. **90 Minuten** bei Raumtemperatur auf einem Schüttler mit 400 U/min inkubieren.
8. Die Vertiefungen waschen, wie in Schritt 5 beschrieben.
9. **100 µL Substrate Solution** in jedes Well pipettieren.
10. **15 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
11. Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von **100 µL Stop Solution** in jedes Well abstoppen.
12. Die Optische Dichte (OD) der Lösung in jedem Well bei **450 nm (Messung) und 620 nm bis 630 nm (Abzug des Hintergrundes, empfohlen)** mit einem Mikrotiterplattenleser bestimmen.
Es wird empfohlen, die Vertiefungen **innerhalb von 10 Minuten** nach Zugabe der Stopplösung abzulesen.

6.3 Berechnung der Ergebnisse

1. Die Konzentration der Proben kann direkt von der Standardkurve abgelesen werden.
2. Bei Doppelbestimmungen muss für jeden Standard, jede Kontrolle und Patientenproben der Mittelwert der beiden OD-Werte verwendet werden. Weichen die beiden Werte erheblich voneinander ab, empfiehlt DEMEDITEC, die Proben erneut zu testen.
3. Proben mit Konzentrationen, die den höchsten Standard überschreiten, können mit *Assay Buffer* weiter verdünnt und wie unter "Testdurchführung" beschrieben erneut gemessen werden oder müssen als > 128 pg/mL angegeben werden. Bei der Berechnung der Konzentrationen muss dieser Verdünnungsfaktor berücksichtigt werden.
4. Automatische Methode:
Die in der Gebrauchsanweisung angegebenen Ergebnisse wurden automatisch mit Hilfe der 4-Parameter-Gleichung bestimmt. (4-Parameter-Rodbard oder 4-Parameter-Marquardt sind die bevorzugten Methoden.) Andere Auswertungsfunktionen können leicht abweichende Werte ergeben.
5. Manuelle Methode:
Erstellen Sie unter Verwendung von linearem Millimeterpapier eine Standardkurve, indem Sie die (mittlere) OD jedes Standards gegen seine Konzentration auftragen, wobei der OD-Wert auf der vertikalen (Y) Achse und die Konzentration auf der horizontalen (X) Achse liegt. Bestimmen Sie die entsprechende Probenkonzentration anhand der Standardkurve, indem Sie den (mittleren) OD-Wert für jede Probe verwenden.

6.3.1 Beispiel einer typischen Standardkurve

Die folgenden Daten dienen nur zur Orientierung und dürfen **nicht** anstelle der Datengenerierung zum Zeitpunkt des Tests verwendet werden.

| Standard | Optische Dichte (450 nm) |
|------------------------|--------------------------|
| Standard 0 (0 pg/mL) | 0,170 |
| Standard 1 (4 pg/mL) | 0,284 |
| Standard 2 (16 pg/mL) | 0,544 |
| Standard 3 (32 pg/mL) | 0,885 |
| Standard 4 (64 pg/mL) | 1,573 |
| Standard 5 (128 pg/mL) | 2,586 |

7 REFERENZWERTE

Es wird dringend empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzwerte ermittelt.

In einer Studie wurden die Proben von gesunden Erwachsenen untersucht. Dabei ergaben sich mit dem DEMEDITEC Renin ELISA folgende Werte in EDTA-Plasma:

| Gesunde Probanden | n | Mittelwert (pg/mL) | Median (pg/mL) | 2,5. - 97,5. Perzentil (pg/mL) | Bereich (min. - max.) (pg/mL) |
|--------------------|----|--------------------|----------------|--------------------------------|-------------------------------|
| liegende Position | 59 | 16,23 | 12,40 | < 2,50 – 53,83 | < 2,50 – 58,78 |
| aufrechte Position | 59 | 19,73 | 16,18 | 2,79 – 61,83 | < 2,50 – 95,56 |

Diese Werte gelten auch für Serum.

In einer Studie wurden die Proben von gesunden Erwachsenen untersucht. Dabei ergaben sich mit dem DEMEDITEC Aldosterone ELISA (DE5298) und dem DEMEDITEC Renin ELISA folgende **Aldosteron-Renin-Quotienten** in EDTA-Plasma:

Aldosteron-Renin-Quotienten (pg/mL/pg/mL)

| | n | Mittelwert | Median | 2,5. - 97,5. Perzentile |
|--------------------|----|------------|--------|-------------------------|
| Gesunde Erwachsene | 89 | 8,68 | 5,30 | 0,52 – 37,83 |

Diese Werte gelten auch für Serum.

Werte, die über oder unter dem Referenzbereich liegen, sollten als verdächtig angesehen werden und erfordern zusätzliche Untersuchungen. Die mit diesem Testkit erzielten Ergebnisse sollten niemals als alleinige Grundlage für therapeutische Konsequenzen dienen. Die Ergebnisse müssen zusammen mit anderen klinischen Befunden und diagnostischen Tests des Patienten interpretiert werden.

8 QUALITÄTSKONTROLLE

Eine gute Qualitätssicherung im Labor erfordert, dass mit jeder Standardkurve Kontrollen mitgeführt werden. Eine statistisch signifikante Anzahl von Kontrollen sollte gemessen werden, um Mittelwerte und Akzeptanzbereiche zu ermitteln und damit eine korrekte Testdurchführung zu gewährleisten. Es wird empfohlen, die Kontrollproben gemäß den nationalen gesetzlichen Bestimmungen einzusetzen. Durch die Verwendung von Kontrollproben wird eine Tag-zu-Tag-Überprüfung der Ergebnisse erzielt. Es sollten Kontrollen sowohl mit normalem als auch pathologischem Level eingesetzt werden. Die Kontrollen mit den entsprechenden Ergebnissen des QC-Labors sind im Analysenzertifikat (CoA), das dem Kit beiliegt, aufgeführt. Die im CoA angegebenen Werte und Bereiche beziehen sich stets auf die aktuelle Kitcharge und sollen zum direkten Vergleich der Ergebnisse verwendet werden. Falls verfügbar, wird ebenfalls empfohlen, an nationalen oder internationalen Qualitätssicherungsprogrammen teilzunehmen, um die Genauigkeit der Ergebnisse zu sichern. Es sollten geeignete statistische Methoden zur Analyse von Kontrollwerten und Trends angewendet werden. Wenn die Ergebnisse des Assays nicht mit den angegebenen Akzeptanzbereichen des Kontrollmaterials übereinstimmen, sollten die Patientenergebnisse als ungültig eingestuft werden. In diesem Fall überprüfen Sie bitte die folgenden Bereiche: Pipetten und Zeitnehmer, Photometer, Verfallsdaten der Reagenzien, Lagerungs- und Inkubationsbedingungen, Absaug- und Waschmethode. Sollten nach Überprüfung der vorgenannten Bereiche keine Fehler erkennbar sein, setzen Sie sich bitte mit Ihrem Lieferanten oder direkt mit der Firma DEMEDITEC in Verbindung.

9 LEISTUNGSMERKMALE

9.1 Spezifität der Antikörper (Kreuzreaktivität)

Ausführliche Informationen zu den getesteten Substanzen finden Sie in der englischen Version der Gebrauchsanweisung.

9.2 Sensitivität

| | |
|------------------------------|-------------------------|
| „Limit of Blank“ (LoB) | 2,499 pg/mL |
| Nachweisgrenze (LoD) | 4,308 pg/mL |
| Quantifizierungsgrenze (LoQ) | 6,021 pg/mL |
| | |
| Messbereich | 2,499 pg/mL – 128 pg/mL |
| Linearer Bereich | 2,850 pg/mL – 128 pg/mL |

Die Daten zu:

9.3 Reproduzierbarkeit (Präzision)

9.4 Wiederfindung

9.5 Linearität

9.6 Methodenvergleich

entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Version der Gebrauchsanweisung.

10 GRENZEN DES VERFAHRENS

Zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse werden erzielt, wenn das Testverfahren mit vollständigem Verständnis der Gebrauchsanweisung und unter Einhaltung der Richtlinien zur Qualitätssicherung im Labor durchgeführt wird. Jede unsachgemäße Handhabung der Proben oder eine Modifikation dieses Tests kann die Ergebnisse beeinflussen.

10.1 Störsubstanzen

Hämoglobin (bis zu 4 mg/mL), Bilirubin (bis zu 0,5 mg/mL) und Triglyceride (bis zu 30 mg/mL) haben keinen Einfluss auf das Testergebnis.

10.2 Beeinflussung durch Medikamente

Informationen zu den getesteten Substanzen (Medikamente) entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Gebrauchsanweisung.

10.3 High-Dose-Hook-Effekt

Ein Hook-Effekt tritt in diesem Test bis zu einer Konzentration von 8200 pg/mL Renin nicht auf.

11 RECHTLICHE GRUNDLAGEN

11.1 Zuverlässigkeit der Ergebnisse

Der Test muss exakt gemäß der Testanleitung des Herstellers abgearbeitet werden. Darüber hinaus muss der Anwender die Richtlinien zur Qualitätssicherung im Labor und anwendbare nationale Normen und/oder Gesetze strikt einhalten. Dies betrifft besonders den Gebrauch der Kontrollreagenzien. Es ist sehr wichtig, bei der Testdurchführung stets eine ausreichende Anzahl Kontrollen zur Überprüfung der Genauigkeit und Präzision mitzuführen. Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn alle Kontrollen in den vorgegebenen Bereichen liegen, und wenn alle anderen Testparameter die vorgegebenen Spezifikationen für diesen Assay erfüllen. Wenn bezüglich eines Ergebnisses Zweifel oder Bedenken bestehen, setzen Sie sich bitte mit der Firma DEMEDITEC in Verbindung.

11.2 Therapeutische Konsequenzen

Therapeutische Konsequenzen sollten keinesfalls nur aufgrund von Laborergebnissen erfolgen, selbst dann nicht, wenn alle Testergebnisse mit den in 11.1 genannten Voraussetzungen übereinstimmen. Jedes Laborergebnis ist nur ein Teil des klinischen Gesamtbildes eines Patienten. Nur in Fällen, in denen die Laborergebnisse in akzeptabler Übereinstimmung mit dem allgemeinen klinischen Bild des Patienten stehen, sollten therapeutische Konsequenzen eingeleitet werden. Das Testergebnis allein sollte niemals als alleinige Grundlage für die Einleitung therapeutischer Konsequenzen dienen.

11.3 Haftung

Jegliche Veränderungen des Testkits und/oder Austausch oder Vermischung von Komponenten unterschiedlicher Chargen von einem Testkit zu einem anderen, können die gewünschten Ergebnisse und die Gültigkeit des gesamten Tests negativ beeinflussen. Solche Veränderungen und/oder Austausch haben den Ausschluss jeglicher Ersatzansprüche zur Folge. Reklamationen, die aufgrund von Falschinterpretation von Laborergebnissen durch den Kunden gemäß Punkt 11.2 erfolgen, sind ebenfalls abzuweisen. Im Falle jeglicher Reklamation ist die Haftung des Herstellers maximal auf den Wert des Testkits beschränkt. Jegliche Schäden, die während des Transports am Kit entstanden sind, unterliegen nicht der Haftung des Herstellers.

11.4 Meldung von schwerwiegenden Vorkommnissen

Jedes schwerwiegende Vorkommnis im Zusammenhang mit dem Produkt ist dem Hersteller und der zuständigen Behörde des Mitgliedstaats, in dem der Anwender und/oder der Patient niedergelassen ist, zu melden.

1 DESTINAZIONE D'USO

DEMEDIATEC Renin ELISA è un test immunoenzimatico manuale per la misurazione **quantitativa** di Renina attiva nel siero o nel EDTA plasma umano.

Per uso diagnostico *in vitro*. Per uso professionale di laboratorio.

Per ulteriori informazioni sulla destinazione d'uso, consultare le istruzioni per l'uso in inglese.

2 PRINCIPIO DEL TEST

Il test DEMEDIATEC Renin ELISA è un dosaggio immuno-assorbente legato a un enzima a fase solida (ELISA) basato sul **principio sandwich**. I pozzetti per microtitolazione sono rivestiti con un anticorpo monoclonale (topo) diretto verso un sito antigenico unico della molecola di Renina. Durante la prima incubazione (insieme al tampone del dosaggio), l'analita Renina nel campione aggiunto si lega all'anticorpo immobilizzato. Il coniugato enzimatico aggiunto successivamente, che contiene un anticorpo monoclonale anti-Renina coniugato alla perossidasi di rafano, si lega all'analita Renina formando un complesso sandwich. Dopo una fase di lavaggio per rimuovere tutte il coniugato enzimatico non legato, la fase solida viene incubata con la soluzione di substrato. La reazione colorimetrica viene bruscamente interrotta con l'aggiunta di soluzione di arresto e viene misurata la densità ottica (DO) del prodotto giallo risultante. L'intensità della colorazione è proporzionale alla concentrazione dell'analita nel campione. Una curva standard viene costruita tracciando i valori di DO rispetto alle concentrazioni di standard; le concentrazioni di campioni sconosciuti vengono determinate usando questa curva standard.

3 AVVERTENZE E PRECAUZIONI

- Questo kit è solo per uso diagnostico *in vitro*. Solo per uso professionale di laboratorio.
- Prima di avviare il dosaggio, leggere completamente e attentamente le istruzioni per l'uso. Utilizzare la versione valida delle istruzioni per l'uso fornita con il kit. Assicurarsi che tutto sia stato compreso.
- Non miscelare o utilizzare componenti provenienti da kit con un diverso numero di lotto. Si raccomanda di non scambiare pozzetti di piastre diverse, anche se dello stesso lotto. I kit potrebbero essere stati spediti o conservati in condizioni differenti e le caratteristiche di legame delle piastre potrebbero essere leggermente diverse.
- Non utilizzare reagenti oltre la data di scadenza riportata sulle etichette del kit.
- Non riutilizzare i pozzetti di microtitolazione.
- Non usare reagenti di altri produttori in combinazione con i reagenti di questo kit di test.
- Tutti i reagenti di questo kit sono liquidi trasparenti; la soluzione di substrato è trasparente e incolore. Modifiche nell'aspetto possono influenzare le prestazioni del test. In questo caso, contattare DEMEDIATEC.
- La contaminazione microbica dei reagenti o dei campioni può dare risultati falsi.
- Prima di avviare il test, attendere che i reagenti raggiungano la temperatura ambiente (da 20 °C a 26 °C). La temperatura influenza le letture della densità ottica del dosaggio.
- Usare i volumi indicati secondo quanto previsto dal protocollo. I risultati ottimali del test si ottengono solo utilizzando pipette calibrate e lettori di piastre per microtitolazione.
- Utilizzare serbatoi solo per reagenti singoli. Ciò vale in particolare per i serbatoi per il substrato. L'utilizzo di un serbatoio per l'erogazione di una soluzione di substrato precedentemente usato per la soluzione di coniugato potrebbe causare una colorazione della soluzione. Non versare nuovamente i reagenti nelle fiale originali, poiché potrebbe verificarsi una contaminazione.

Precauzioni generali

- Seguire le linee guida per la garanzia di qualità e la sicurezza in laboratorio.
- Non pipettare mai a bocca ed evitare il contatto dei reagenti e dei campioni con la pelle e le mucose.
- Non fumare, mangiare, bere o applicare cosmetici nelle aree dove vengono manipolati campioni o reagenti del kit.
- Quando si maneggiano campioni e reagenti, indossare camici da laboratorio e guanti in lattice monouso e occhiali di sicurezza ove necessario.

Informazioni sul rischio biologico

- Tutti i reagenti di questo kit che contengono siero o plasma umano sono stati testati e confermati negativi rispetto a HIV I/II, HBsAg e HCV usando procedure approvate dalla FDA. Tuttavia, nessun metodo noto può garantire con certezza assoluta che non sia presente alcun agente infettivo.
- Il dispositivo contiene materiale di origine animale, certificato come apparentemente privo di malattie infettive o contagiose e parassiti nocivi.
- I componenti bovini provengono da paesi in cui non è stata segnalata la BSE (Encefalopatia spongiforme bovina).
- Maneggiare tutti i materiali e i campioni di origine umana o animale come potenziali fonti di malattie infettive.
- Manipolare in conformità con le procedure definite dalle linee guida o dai regolamenti nazionali in materia di rischio biologico e sicurezza. Smaltire i rifiuti secondo le norme e i regolamenti locali.

Informazioni sul rischio chimico e sulla classificazione dei pericoli

- Alcuni reagenti contengono conservanti in concentrazioni non dichiarabili. Tuttavia, in caso di contatto con gli occhi o la pelle, sciacquare immediatamente con acqua.
- La soluzione di substrato contiene un ingrediente in concentrazioni non dichiarabili che provoca grave irritazione oculare. In caso di contatto con gli occhi, sciacquare subito accuratamente ed abbondantemente con una soluzione di lavaggio oculare o acqua. Dopo il contatto con la pelle, lavare abbondantemente con acqua. Togliere gli indumenti contaminati e lavarli prima di riutilizzarli.
- Evitare il contatto con la soluzione di arresto contenente < 5 % H₂SO₄. Può provocare irritazioni e ustioni alla pelle.
- Trattare i prodotti chimici e i reagenti preparati o usati come rifiuti pericolosi secondo le linee guida o i regolamenti nazionali sulla sicurezza.
- Questo prodotto non contiene sostanze con proprietà cancerogene, mutagene o tossiche per la riproduzione (CMR).

4 MATERIALI

4.1 Materiali forniti nel kit

1. **SORB** **MT** **Microtiterwells** 12 x 8 pozzetti (separabili), pronto all'uso; Piastra per microtitolazione, rivestita di anticorpo anti-Renina (monoclonale).
2. **CAL** **0 – 5** **LYO** **Standard (Standard 0-5)** 6 x 1 mL, liofilizzato; *Vedere "Preparazione dei reagenti"*; Standard*, Concentrazioni: 0 – 4 – 16 – 32 – 64 – 128 pg/mL, Conversione: 1 pg/mL = 1,44 µIU/mL. *Calibrato rispetto al seguente materiale di riferimento: WHO 1st International Standard for Renin 68/356.*
3. **CONTROL** **low & high** **LYO** **Control Low & High** 2 x 1 mL; liofilizzato; *Vedere "Preparazione dei reagenti"*; Controlli*, *per gli intervalli e i valori di controllo vedere l'etichetta della fiala o il certificato di analisi (CoA).*
4. **BUF** **Assay Buffer** 1 x 20 mL, pronto all'uso; Tampone del dosaggio*.
5. **ENZ** **CONJ** **Enzyme Conjugate** 1 x 14 mL, pronto all'uso; Coniugato enzimatico*, anticorpo monoclonale anti-Renina umana coniugato con perossidasi di rafano.
6. **SUB** **TMB** **Substrate Solution** 1 x 14 mL, pronto all'uso; Soluzione di substrato, contiene 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). *Conservare al riparo dalla luce solare diretta.*
7. **STOP** **SOLN** **Stop Solution** 1 x 14 mL, pronto all'uso; Soluzione di arresto, contiene < 5 % H₂SO₄. *Evitare il contatto con la soluzione di arresto. Potrebbe causare irritazioni cutanee e ustioni.*
8. **WASH** **SOLN** **40x** **Wash Solution** 1 x 30 mL, *vedere „Preparazione dei reagenti“.* Soluzione di lavaggio, Concentrato 40X*.
9. 1x **Istruzioni per l'uso (IFU)**; 1x **Certificato di analisi (CoA)**

* Contiene un conservante privo di mercurio.

4.2 Materiali necessari ma non forniti

- Lettore di piastre per microtitolazione calibrato (450 nm, con lunghezza d'onda di riferimento tra 620 nm e 630 nm)
- Micropipette a precisione variabile, calibrate
- Incubatore a 37 °C
- Dispositivo di lavaggio manuale o automatico per piastre per microtitolazione
- Carta assorbente
- Acqua distillata
- Timer
- Carta millimetrata o software per il calcolo dei dati
- Agitatore per micropiastre (400 rpm)

4.3 Conservazione e stabilità del kit

I kit e i reagenti non aperti e i reagenti aperti devono essere conservati a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C. La micropiastra deve sempre essere conservata nel sacchetto richiudibile in alluminio contenente un essiccante. Non aprire il sacchetto finché non ha raggiunto la temperatura ambiente. La piastra per microtitolazione è costituita da 12 strisce singole. Ogni striscia può essere suddivisa in 8 pozzetti singoli. I pozzetti inutilizzati devono essere immediatamente riposti nel sacchetto in alluminio contenente l'essiccante, richiusi ermeticamente e conservati a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C.

Dopo l'apertura, le fiale di reagente devono essere nuovamente chiuse ermeticamente.

| | Temperatura di conservazione | Stabilità |
|--------------------------------------|------------------------------|---|
| Kit non aperto e reagenti non aperti | 2 °C a 8 °C | Fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta. Non utilizzare i reagenti dopo questa data! |
| Kit aperti | 2 °C a 8 °C | 8 settimane (Per i reagenti ricostituiti fare riferimento alla sezione "4.4 Preparazione dei reagenti".) |

4.4 Preparazione dei reagenti

Prima dell'uso portare tutti i reagenti e il numero necessario di pozzetti a temperatura ambiente (20 °C a 26 °C).

Standard

Ricostituire il contenuto liofilizzato di ogni fiala standard con 1 mL di acqua distillata e lasciare riposare per almeno 10 minuti a temperatura ambiente. Mescolare più volte prima dell'uso.

| | | |
|-----------------------------------|------------------------|----------------|
| Stabilità dopo la ricostituzione: | da 2 °C a 8 °C | 14 giorni |
| | a -20 °C (in aliquote) | fino a 12 mesi |

Controlli

Ricostituire il contenuto liofilizzato di ogni fiala di controllo con 1 mL di acqua distillata e lasciare riposare per almeno 10 minuti a temperatura ambiente. Mescolare più volte prima dell'uso.

| | | |
|-----------------------------------|------------------------|----------------|
| Stabilità dopo la ricostituzione: | da 2 °C a 8 °C | 14 giorni |
| | a -20 °C (in aliquote) | fino a 12 mesi |

Soluzione di lavaggio

Aggiungere acqua distillata alla soluzione di lavaggio con concentrazione di 40X. Diluire 30 mL soluzione di lavaggio concentrata con 1170 mL di acqua distillata fino a un volume finale di 1200 mL.

| | | |
|-------------------------------|------------------|-------------|
| Stabilità dopo la diluizione: | da 20 °C a 26 °C | 1 settimana |
|-------------------------------|------------------|-------------|

4.5 Smaltimento del kit

Lo smaltimento del kit e di tutti i materiali/reagenti usati deve essere effettuato nel rispetto delle normative nazionali. Informazioni specifiche su questo prodotto sono riportate nella Scheda di Sicurezza, sezione 13.

4.6 Kit di test danneggiati

In caso di danni al kit del test o ai componenti, DEMEDITEC deve essere informato per iscritto, al più tardi una settimana dopo la ricezione del kit. I singoli componenti danneggiati non devono essere utilizzati per i test. Devono essere invece conservati fino a quando non è stata individuata una soluzione definitiva. Successivamente potranno essere smaltiti secondo le norme in vigore.

5 PRELIEVO, CONSERVAZIONE E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

In questo test è possibile utilizzare il seguente materiale campione:

Siero umano o plasma EDTA

Campioni contenenti azoturo di sodio non devono essere utilizzati nel dosaggio. In generale si dovrebbe evitare l'uso di campioni emolitici, itterici o lipemici. Per ulteriori informazioni consultare il capitolo "Sostanze interferenti".

Le condizioni alle quali i campioni sono raccolti devono essere controllati accuratamente, dato che alcuni fattori fisiologici possono influenzare la secrezione della renina. Questi includono:

- La posizione: il paziente deve rimanere sdraiato per più di 1 ora o deve stare in piedi per più di 1 ora.
- Le oscillazioni giornalieri di renina: il campionamento deve essere effettuato tra le ore 7 e 10 del mattino, se possibile.
- La dieta: il contenuto di sodio nella dieta deve essere noto ed eventualmente controllato dalla misura di sodio nell'urina per un periodo di 24 ore.
- La medicazione: il livello di renina attiva può essere influenzata da una medicazione anti-ipertensione (p.es. Diuretici, inibitori ACE, beta bloccanti adrenergici o vasodilatatori).
- La gravidanza: i livelli di renina attiva ed inattiva cresce durante la gravidanza.
- Il ciclo mestruale: il livello di renina attiva cresce nella seconda fase del ciclo (il campionamento deve essere effettuato possibilmente durante la prima fase).
- L'età: il livello di renina attiva decresce con l'età.

5.1 Prelievo dei campioni

Siero: Prelevare il sangue mediante venipuntura (ad es. Sarstedt Monovette per siero), far coagulare e separare il siero centrifugando a temperatura ambiente. Non centrifugare prima che la coagulazione sia completata. Campioni di pazienti in terapia anticoagulante potrebbero richiedere più tempo per la coagulazione.

Plasma: Prelevare il sangue in provette da centrifuga contenenti un anticoagulante (ad es. Sarstedt Monovette con un'adeguata preparazione per il plasma) e centrifugare subito dopo il prelievo.

Il sangue intero non deve essere congelato prima della centrifugazione.

5.2 Conservazione dei campioni

I campioni devono essere conservati ben tappati prima di eseguire il dosaggio. Se vengono conservati in congelatore, congelarli solo una volta. I campioni scongelati devono essere invertiti più volte prima di eseguire il test.

| | | | |
|-----------|--------------------------|----------------|---|
| Stabilità | da 2 °C a 8 °C | NON stabile | Conservare a temperatura ambiente e NON a 2 °C - 8 °C prima dell'analisi, poiché nell'intervallo di temperatura compreso tra 2 °C e 8 °C può verificarsi la crioattivazione della prorenina, che dà valori falsi positivi di renina attiva > 128 pg/mL (12,13, 14). Per inattivare la prorenina attivata, incubare il campione per una notte a 37 °C e ripetere la misurazione. Se i campioni non possono essere analizzati <u>entro 4 ore</u> dal prelievo, conservarli congelati. Si raccomanda di congelare e scongelare rapidamente i campioni evitando un intervallo di temperatura compreso tra 2 °C e 8 °C. Per le procedure di congelamento rapido si può usare un bagno di ghiaccio secco/etanolo. |
| | a temperatura ambiente | < 4 ore | |
| | a ≤ -20 °C (in aliquote) | fino a 12 mesi | |

5.3 Preparazione dei campioni

I campioni possono essere analizzati senza ulteriore preparazione.

Se in un'analisi iniziale si osserva che un campione contiene una quantità di analita superiore allo standard più elevato, il campione può essere diluito con il *Assay Buffer* e analizzato nuovamente come descritto nella procedura di analisi.

Nota importante: valori superiori allo standard più elevato (> 128 pg/mL) possono essere causati da:

1. concentrazioni molto elevate di renina (solo in rari casi). In questo caso, seguire le istruzioni per la diluizione riportate di seguito.
2. Crioattivazione della Prorenina in Prorenina attivata a causa di una conservazione inadeguata del campione. In questo caso, seguire le istruzioni fornite nel capitolo 5.2.

Se è necessaria una diluizione, il campione deve essere diluito almeno 1:10 con il tampone del dosaggio. Per il calcolo delle concentrazioni si deve tenere conto di questo fattore di diluizione.

Esempio:

- a) diluizione 1:10: 20 µL campione + 180 µL *Assay Buffer*; (agitare bene).
- b) diluizione 1:20: 10 µL della diluizione a) + 90 µL *Assay Buffer*; (agitare bene).

6 PROCEDURA DEL DOSAGGIO

6.1 Note sulla procedura

- Portare tutti i reagenti e i campioni a temperatura ambiente (tra 20 °C e 26 °C) prima dell'uso.
- Miscelare tutti i reagenti senza formare schiuma.
- Non scambiare tra loro i tappi delle fiale di reagente per evitare contaminazioni incrociate.
- Per ogni componente, standard, controllo o campione è necessario utilizzare un nuovo puntale di pipettaggio in plastica monouso per evitare il carry-over.
- Per evitare la contaminazione incrociata e risultati falsamente elevati, pipettare i campioni dei pazienti e dispensare il coniugato accuratamente sul fondo dei pozzetti senza produrre schizzi.
- Per garantire risultati ottimali del test, mescolare accuratamente il contenuto dei pozzetti della piastra per microtitolazione.
- Non lasciare asciugare i pozzetti durante il dosaggio; aggiungere i reagenti subito dopo aver completato le fasi di risciacquo.
- Dopo l'avvio del test, completare tutti i passaggi senza interruzioni e seguendo la stessa sequenza per ogni passaggio.
- La reazione enzimatica è linearmente proporzionale al tempo e alla temperatura.
- La densità ottica è una funzione del tempo di incubazione e della temperatura. Rispettare i tempi e le temperature di incubazione come indicato nel capitolo "Procedura del test".
- Prima di avviare il dosaggio, è raccomandato fare in modo che tutti i reagenti siano pronti, i tappi rimossi, tutti i pozzetti necessari fissati sul supporto ecc. Questo garantirà un tempo trascorso identico per ogni fase di pipettaggio senza interruzioni.
- Durante l'incubazione a 37 °C coprire le strisce di microtitolazione con un foglio per evitare l'evaporazione.
- **Nota importante sulla procedura di lavaggio:**
Il lavaggio è fondamentale. I pozzetti lavati in modo improprio daranno risultati errati. La sensibilità e la precisione di questo dosaggio sono notevolmente influenzate dalla corretta esecuzione della procedura di lavaggio!
- **Prestazioni del test utilizzando dispositivi di analisi completamente automatizzati:**
È possibile eseguire test automatizzati utilizzando dispositivi di analisi a sistema aperto completamente automatizzati. Tuttavia, la combinazione deve essere convalidata dall'utente.

6.2 Procedura del test

Ogni analisi deve includere una curva standard. I controlli servono come controlli interni per la valutazione dell'affidabilità della procedura del test. Essi devono essere dosati a ogni esecuzione del test. La procedura del test indicata descrive l'elaborazione manuale.

Nota importante: l'accuratezza di questo dosaggio è notevolmente influenzata dalla corretta temperatura di incubazione, dal tempo di incubazione e dai corretti volumi di pipettaggio.

1. Fissare il numero desiderato di pozzetti di microtitolazione nel telaio di supporto.
2. Pipettare **100 µL** di **Assay Buffer** nei pozzetti appropriati.
3. Pipettare **50 µL** di ogni **Standard, Control, e campione** nei pozzetti appropriati, utilizzando puntali monouso.
Mescolare accuratamente per 10 secondi. In questa fase, è importante che la miscelazione sia completa.
4. Incubare per **90 minuti** a temperatura ambiente su un agitatore per piastre con 400 rpm.
5. Lavare i pozzetti nel modo seguente:
Qualora la fase di lavaggio venga eseguita manualmente:
Agitare energicamente il contenuto dei pozzetti.
Risciacquare ogni pozzetto **4 volte** con **300 µL** di soluzione di lavaggio diluita.
Qualora si usi un dispositivo di lavaggio di micropiastre automatizzato:
Risciacquare ogni pozzetto **4 volte** con **400 µL** di soluzione di lavaggio diluita.
Al termine della fase di lavaggio, scuotere sempre energicamente i pozzetti su carta assorbente per rimuovere le gocce residue
6. Aggiungere **100 µL** di **Enzyme Conjugate** in ogni pozzetto.
7. Incubare per **90 minuti** a temperatura ambiente su un agitatore per piastre con 400 rpm.
8. Lavare i pozzetti come descritto al punto 5.
9. Pipettare **100 µL** di **Substrate Solution** in ogni pozzetto.
10. Incubare per **15 minuti** a temperatura ambiente.
11. Arrestare la reazione enzimatica aggiungendo **100 µL** di **Stop Solution** in ogni pozzetto.
12. Misurare la densità ottica (DO) della soluzione in tutti i pozzetti a **450 nm (lettura) e tra 620 e 630 nm (sottrazione del fondo, consigliata)** utilizzando un lettore per piastre per microtitolazione.
Si consiglia di effettuare la lettura dei pozzetti **entro 10 minuti** dall'aggiunta della soluzione di arresto.

6.3 Calcolo dei risultati

1. La concentrazione dei campioni può essere letta direttamente dalla curva standard.
2. Per le misurazioni duplicate, è necessario considerare la media dei due valori di densità ottica (DO) per ogni standard, controllo e campione di paziente. Se i due valori si discostano sostanzialmente l'uno dall'altro, DEMEDITEC raccomanda di ritestare i campioni.
3. I campioni con concentrazioni superiori a quelle dello standard più elevato possono essere ulteriormente diluiti con *Assay Buffer* e sottoposti di nuovo al test come descritto in "Procedura del test, in alternativa, devono essere refertati come > 128 pg/mL. Per il calcolo delle concentrazioni è necessario considerare questo fattore di diluizione.
4. Metodo automatizzato:
I risultati nelle istruzioni per l'uso sono stati calcolati automaticamente utilizzando un adattamento della curva logistica a quattro parametri (4PL). (I metodi preferiti sono 4PL Rodbard o 4PL Marquardt.) Altre funzioni di riduzione dei dati potrebbero dare risultati leggermente diversi.
5. Metodo manuale:
Utilizzando carta millimetrata lineare, costruire una curva standard tracciando la (media) DO ottenuta da ogni standard contro la rispettiva concentrazione con il valore DO sull'asse verticale (Y) e la concentrazione sull'asse orizzontale (X). Determinare la concentrazione del campione corrispondente dalla curva standard utilizzando il valore OD (medio) per ogni campione.

6.3.1 Esempio di una curva standard tipica

I seguenti dati vengono riportati a scopo esclusivamente dimostrativo e **non possono** sostituire i dati generati al momento di esecuzione del dosaggio.

| Standard | Densità ottica (450 nm) |
|------------------------|-------------------------|
| Standard 0 (0 pg/mL) | 0,170 |
| Standard 1 (4 pg/mL) | 0,284 |
| Standard 2 (16 pg/mL) | 0,544 |
| Standard 3 (32 pg/mL) | 0,885 |
| Standard 4 (64 pg/mL) | 1,573 |
| Standard 5 (128 pg/mL) | 2,586 |

7 VALORI DI RIFERIMENTO

È fortemente consigliato che ogni laboratorio determini i propri valori di riferimento. In uno studio condotto su persone apparentemente sane usando il test DEMEDITEC Renin ELISA, i seguenti valori sono stati ottenuti nel plasma EDTA:

| Donatori sani | n | Media (pg/mL) | Mediano (pg/mL) | 2,5. - 97,5. Percentile (pg/mL) | Intervallo (min. - max.) (pg/mL) |
|------------------|----|---------------|-----------------|---------------------------------|----------------------------------|
| Posizione supina | 59 | 16,23 | 12,40 | < 2,50 – 53,83 | < 2,50 – 58,78 |
| Posizione eretta | 59 | 19,73 | 16,18 | 2,79 – 61,83 | < 2,50 – 95,56 |

Questi valori sono validi anche per il siero.

In uno studio condotto su persone apparentemente sane usando il test DEMEDITEC Aldosterone ELISA (DE5298) e il test DEMEDITEC Renin ELISA, i seguenti **quozienti aldosterone-renina** sono stati ottenuti nel plasma EDTA:

Quozienti Aldosterone-Renina (pg/mL / pg/mL)

| | n | Media | Mediano | 2,5. - 97,5. percentile |
|-------------|----|-------|---------|-------------------------|
| Adulti sani | 89 | 8,68 | 5,30 | 0,52 - 37,83 |

Questi valori sono validi anche per il siero.

Valori superiori o inferiori all'intervallo di riferimento devono essere considerati sospetti e richiedono ulteriori esami. I risultati da soli non dovrebbero essere l'unico motivo per eventuali conseguenze terapeutiche. Correlare i risultati ad altre osservazioni cliniche e test diagnostici.

8 CONTROLLO DI QUALITÀ

Una buona garanzia di qualità in laboratorio richiede che i controlli siano inclusi in ogni curva standard. Un numero statisticamente significativo di controlli dovrebbe essere analizzato per stabilire i valori medi e gli intervalli accettabili per garantire prestazioni adeguate. Si raccomanda di usare campioni di controllo secondo quanto previsto dalle norme locali o nazionali. Si consiglia di utilizzare campioni di controllo per garantire la validità giornaliera dei risultati. Utilizzare controlli sia a livelli normali che a livelli patologici. I controlli e i corrispondenti risultati del Laboratorio di controllo qualità sono riportati nel Certificato di Analisi (CoA) inserito nel kit. I valori e gli intervalli indicati sul Certificato di analisi si riferiscono sempre al lotto del kit corrente e devono essere utilizzati per il confronto diretto dei risultati. Se disponibili, si raccomanda inoltre di partecipare ai programmi nazionali o internazionali della valutazione della qualità per assicurare la precisione dei risultati. Per analizzare i valori di controllo e gli andamenti, utilizzare metodi statistici appropriati. Se i risultati del dosaggio non si adattano agli intervalli di riferimento stabiliti per i controlli, i risultati dei pazienti non possono essere considerati validi. In tal caso, verificare le seguenti aree tecniche: Dispositivi di pipettaggio e temporizzazione; fotometro, date di scadenza dei reagenti, condizioni di conservazione e incubazione, metodi di aspirazione e lavaggio. Dopo aver verificato le voci sopra indicate senza riscontrare alcun errore, contattare il proprio distributore o direttamente DEMEDITEC.

9 CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

9.1 Specificità degli anticorpi (reattività incrociata)

La versione inglese delle istruzioni per l'uso contiene informazioni dettagliate sulle sostanze testate.

9.2 Sensibilità

| | |
|---------------------------------|-------------------------|
| Limite del bianco (LoB) | 2,499 pg/mL |
| Limite di rilevabilità (LoD) | 4,308 pg/mL |
| Limite di quantificazione (LoQ) | 6,021 pg/mL |
| Intervallo di misurazione | 2,499 pg/mL – 128 pg/mL |
| Intervallo lineare | 2,850 pg/mL – 128 pg/mL |

I dati relativi a:

9.3 Riproducibilità (precisione)

9.4 Recupero

9.5 Linearità

9.6 Confronto dei metodi

sono riportati nella versione inglese dettagliata delle istruzioni per l'uso.

10 LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

Se si esegue la procedura del dosaggio con una completa comprensione delle istruzioni per l'uso e in conformità con le linee guida per l'assicurazione della qualità del laboratorio, si ottengono risultati affidabili e riproducibili. Qualsiasi manipolazione impropria dei campioni o modifica di questo test potrebbe influenzare i risultati.

10.1 Sostanze interferenti

L'emoglobina (fino a 4 mg/mL), bilirubina (fino a 0,5 mg/mL) e i trigliceridi (fino a 30 mg/mL) non influiscono in alcun modo sui risultati del dosaggio.

10.2 Interferenze dei farmaci

Per informazioni sulle sostanze (farmaci) testati, vedere le istruzioni per l'uso dettagliate in lingua inglese.

10.3 Effetto gancio a dose elevata

Non viene rilevato alcun "Effetto gancio a dose elevata" fino a 8200 pg/mL di Renin.

11 ASPETTI LEGALI

11.1 Affidabilità dei risultati

Il test deve essere eseguito esattamente secondo quanto previsto dalle istruzioni d'uso del produttore. Inoltre, l'utente deve attenersi rigorosamente alle linee guida di garanzia della qualità del laboratorio e alle standard nazionali e/o leggi in vigore. Questo è particolarmente importante per l'uso dei reagenti di controllo. È importante includere sempre, all'interno della procedura del test, un numero sufficiente di controlli per convalidare l'accuratezza e la precisione del test. I risultati del test sono validi solo se tutti i controlli sono compresi negli intervalli specificati e se anche tutti gli altri parametri del test rientrano nelle specifiche del dosaggio. In caso di dubbi o preoccupazioni in relazione a un risultato, contattare DEMEDITEC.

11.2 Conseguenze terapeutiche

Le conseguenze terapeutiche non devono mai basarsi esclusivamente sui risultati di laboratorio, anche qualora tutti i risultati dei test concordino con gli elementi come indicato al punto 11.1. Qualsiasi risultato di laboratorio costituisce solo una parte del quadro clinico complessivo di un paziente. Si dovrebbero trarre conseguenze terapeutiche solo nei casi in cui i risultati di laboratorio concordino in modo accettabile con il quadro clinico complessivo del paziente. Il risultato del test, di per sé, non deve mai essere l'unico fattore determinante per una decisione terapeutica.

11.3 Responsabilità legali

Qualsiasi modifica del kit di test e/o scambio o miscela di qualsiasi componente di lotti diversi da un kit di test a un altro potrebbe influenzare negativamente i risultati previsti e la validità del test nel suo complesso. Tali modifiche e/o scambi rendono nulla qualsiasi richiesta di sostituzione. Anche i reclami presentati a causa di un'errata interpretazione da parte del cliente dei risultati di laboratorio indicati al punto 11.2 non saranno ritenuti validi. In ogni caso, in caso di reclamo, la responsabilità del produttore non potrà superare il valore del kit di test. Il produttore non sarà responsabile di eventuali danni causati al kit di test durante il trasporto.

11.4 Segnalazione di incidenti gravi

Tutti gli incidenti gravi relativi a questo prodotto devono essere notificati al fabbricante e all'autorità competente dello Stato membro di residenza dell'utente e/o del paziente.

1 FINALIDAD PREVISTA

El **DEMEDIATEC Renin ELISA** es un inmunoensayo enzimático manual para realizar diagnósticos **cuantitativos** de Renina activa en suero humano o plasma EDTA.

Para uso diagnóstico *in vitro*. Para uso profesional de laboratorio.

Para obtener más información sobre el uso previsto, consulte la versión en inglés de las instrucciones de uso.

2 PRINCIPIO DEL TEST

El DEMEDIATEC Renin ELISA es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) en fase sólida basado en el **principio de sándwich**. Los pocillos de microtítulo están recubiertos de un anticuerpo monoclonal (ratón) que tiene como diana una única zona antigénica de la molécula de Renina activa humana. Durante la primera incubación (junto con el tampón de ensayo), el Renina de la muestra añadida se une al anticuerpo inmovilizado. Después de la incubación, se lavan los componentes no unidos. El conjugado enzimático añadido posteriormente, que contiene un anticuerpo monoclonal de anti-Renina conjugado con peroxidasa de rábano, se une al Renina para formar un compuesto de tipo sándwich. Tras un proceso de lavado para eliminar todo el conjugado enzimático no unido, la fase sólida se incuba con la solución de sustrato. La reacción colorimétrica se detiene añadiendo una solución de parada, y se realiza una medición de la densidad óptica (DO) del producto amarillo resultante. La intensidad del color es proporcional a la concentración del analito en la muestra. Se crea una curva estándar cotejando los valores de DO con las concentraciones de estándares, y las concentraciones de las muestras desconocidas se determinan usando esta curva estándar.

3 ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- Este kit es exclusivo para diagnóstico *in vitro*. Para uso profesional exclusivo de laboratorio.
- Antes de iniciar el ensayo, lea todas las instrucciones de uso detenidamente. Utilice la versión en vigor de las instrucciones de uso suministradas junto con el kit. Asegúrese de que todo está claro.
- No mezcle ni utilice componentes de kits con números de lote distintos. No es aconsejable intercambiar pocillos de placas diferentes, aun cuando pertenezcan al mismo lote. Puede que los kits se hayan enviado o almacenado en unas condiciones distintas y existe la posibilidad de que las características de unión de las placas sean ligeramente diferentes.
- No use los reactivos una vez superada la fecha de caducidad indicada en las etiquetas del kit.
- No reutilice los pocillos de microtítulo.
- No use reactivos de otros fabricantes junto con los reactivos de este kit de prueba.
- Todos los reactivos incluidos en este kit son líquidos transparentes. La solución de sustrato es transparente e incolora. Cualquier cambio en su apariencia podría afectar al rendimiento de la prueba. Si así es, póngase en contacto con DEMEDIATEC.
- Una contaminación microbiana de los reactivos o de las muestras podría arrojar resultados falsos.
- Antes de iniciar la prueba, deje que los reactivos alcancen la temperatura ambiente (entre 20 °C y 26 °C). La temperatura afectará a las lecturas de densidad óptica del ensayo.
- Todos los volúmenes indicados se deben respetar siguiendo el protocolo. Solo se obtendrán unos resultados de prueba óptimos si se usan pipetas calibradas y lectores de placas de microtítulo.
- Utilice depósitos solo con reactivos únicos. Esto es especialmente cierto en el caso de los depósitos de sustratos. Si se usa un depósito para dispensar una solución de sustrato que ya se usó previamente con la solución de conjugado, la solución podría acabar tiznada. No vierta reactivo de nuevo a su vial original, ya que podría producirse una contaminación del reactivo.

Precauciones generales

- Siga las directrices de garantía de calidad y seguridad en el laboratorio.
- No pipetee nunca con la boca y evite el contacto con los reactivos y las muestras con la piel y las membranas mucosas.
- No fume, coma, beba ni aplique sustancias cosméticas en las áreas de manipulación de muestras o reactivos del kit.
- Utilice batas de laboratorio y guantes de látex desechables al manipular reactivos y, si fuera necesario, gafas protectoras también.

Información de riesgo biológico

- Todos los reactivos de este kit de prueba que contienen plasma o suero humano se han analizado y se ha confirmado su negativo en HIV I/II, HBsAg y HCV mediante procedimientos aprobados de la FDA. Pese a ello, no existe ningún método de prueba conocido que ofrezca garantía total de no presencia de agentes infecciosos.
- El producto contiene materia de origen animal certificado como aparentemente libre de enfermedades contagiosas o infecciosas y parásitos nocivos.
- Los componentes bovinos proceden de países en los que no se han notificado casos de EEB (encefalopatía espongiforme bovina).
- Todas las materias y muestras de origen humano o animal deben tratarse como si existiera la posibilidad de transmisión de enfermedades infecciosas.
- La manipulación de material debe realizarse siguiendo los procedimientos establecidos según la normativa o instrucción de seguridad y riesgo biológico nacional pertinente. Los residuos deben desecharse respetando las normativas o regulaciones locales correspondientes.

Información sobre riesgos químicos y la clasificación de riesgos

- Algunos reactivos contienen conservantes con niveles de concentración no declarables. Aún así, en caso de contacto con los ojos o la piel, enjuague de inmediato con agua.
- La solución de sustrato contiene un ingrediente con niveles de concentración no declarables que puede provocar irritaciones de los ojos graves. En caso de posible contacto con los ojos, enjuáguelos concienzudamente de inmediato con agua o con algún colirio. Tras un contacto con la piel, lave con abundante agua. Quítese la ropa contaminada y lávela antes de volver a utilizarla.
- Evite el contacto con una solución de parada que contenga < 5 % H₂SO₄. Puede provocar irritación cutánea o quemaduras.
- Los componentes químicos y los reactivos preparados o usados se deben tratar como desecho peligroso siguiendo la normativa o instrucción de seguridad nacional pertinente.
- Este producto no contiene sustancias con propiedades carcinogénicas, mutagénicas o tóxicas para la reproducción (CMR).

4 MATERIAL

4.1 Material suministrado junto con el kit

1. **SORB MT Microtiterwells** 12 x 8 (por separado), listo para usar; Placa de microtítulo, recubierta de anticuerpo de anti-Renina (monoclonal).
2. **CAL 0 – 5 LYO Standard (Standard 0-5)**, 6 x 1 mL, liofilizado; ver «Preparación de los reactivos»; Estándares*, concentraciones: 0 – 4 – 16 – 32 – 64 – 128 pg/mL. Conversión: 1 pg/mL = 1,44 μIU/mL, *calibrado con el siguiente material de referencia: WHO 1st International Standard for Renin 68/356.*
3. **CONTROL low & high LYO Control Low & High**, 2 x 1 mL, liofilizado; ver «Preparación de los reactivos»; Controles*, *para obtener los intervalos y valores de control, consulte la etiqueta del vial o el certificado de análisis (CoA).*
4. **BUF Assay Buffer** 1 x 20 mL, listo para usar; Tampón de ensayo*.
5. **ENZ CONJ Enzyme Conjugate** 1 x 14 mL, listo para usar; Conjugado enzimático*, anticuerpo monoclonal anti-Renina humana conjugado con peroxidasa de rábano.
6. **SUB TMB Substrate Solution** 1 x 14 mL, listo para usar; Solución de sustrato, contiene 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). *Mantener lejos de la luz solar directa.*
7. **STOP SOLN Stop Solution** 1 x 14 mL, listo para usar, Solución de parada, contiene < 5 % H₂SO₄. *Evite el contacto con la solución de parada. Puede provocar irritación cutánea o quemaduras.*
8. **WASH SOLN 40x Wash Solution** 1 x 30 mL, ver «Preparación de los reactivos»; Solución de lavado, Concentrado 40X*.
9. 1x **Instrucciones de uso (IFU)**; 1x **Certificado de análisis (CoA)**

* Contiene conservante sin mercurio.

4.2 Materiales necesarios no suministrados

- Un lector de placas de microtítulo calibrado (450 nm, con una longitud de onda de referencia de entre 620 nm y 630 nm)
- Micropipetas de precisión variable calibradas
- Incubadora a 37 °C
- Equipamiento manual o automático para lavar los pocillos de placa de microtítulo
- Papel absorbente
- Agua destilada
- Cronómetro
- Papel cuadriculado o software para la reducción de datos
- Agitador de microplacas (400 rpm)

4.3 Almacenamiento y estabilidad del kit

Los reactivos y kits sin abrir, así como **los reactivos abiertos**, se deben almacenar a una temperatura entre 2 °C y 8 °C. La microplaca siempre debe almacenarse en la bolsa de aluminio con cierre que contiene desecante. No abra la bolsa hasta que alcance la temperatura ambiente. La placa de microtítulo consta de 12 tiras individuales. Cada tira está dividida en 8 pocillos individuales. Los pocillos sin utilizar deben volverse a colocar inmediatamente en la bolsa de aluminio con el desecante y almacenarse de nuevo bien cerrados a 2 °C y 8 °C.

Una vez abiertos, los viales de reactivo se deben volver a cerrar herméticamente.

| | Temperatura de almacenamiento | Estabilidad |
|---------------------------|-------------------------------|---|
| Kit y reactivos sin abrir | 2 °C a 8 °C | Hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta impresa. No use los reactivos una vez superada esta fecha. |
| Kit abierto | 2 °C a 8 °C | 8 semanas (Respecto a los reactivos reconstituidos, consulte el apartado «4.4 Preparación de los reactivos»). |

4.4 Preparación de los reactivos

Antes de usarlos, espere a que todos los reactivos y la cantidad de bandas necesaria estén a temperatura ambiente (20 °C a 26 °C).

Standards

Reconstituya el contenido liofilizado de cada vial de estándar con 1 mL de agua destilada y déjelo estar al menos durante 10 minutos a temperatura ambiente. Mezcle varias veces antes de su uso.

| | | |
|-------------------------------------|-------------------------|----------------|
| Estabilidad tras la reconstitución: | entre 2 °C y 8 °C | 14 días |
| | a -20 °C (en alícuotas) | hasta 12 meses |

Controls

Reconstituya el contenido liofilizado de cada vial de control con 1 mL de agua destilada y déjelo estar al menos durante 10 minutos a temperatura ambiente. Mezcle varias veces antes de su uso.

| | | |
|-------------------------------------|-------------------------|----------------|
| Estabilidad tras la reconstitución: | entre 2 °C y 8 °C | 14 días |
| | a -20 °C (en alícuotas) | hasta 12 meses |

Wash Solution

Añada agua destilada a la solución de lavado concentrada a 40X (*Wash Solution*). Diluya 30 mL de solución de lavado concentrada con 1170 mL de agua destilada hasta llegar a un volumen final de 1200 mL.

| | | |
|-------------------------------|---------------------|----------|
| Estabilidad tras la dilución: | entre 20 °C y 26 °C | 1 semana |
|-------------------------------|---------------------|----------|

4.5 Eliminación del kit

El kit y todo los materiales/reactivos usados deberán desecharse siguiendo la regulación nacional correspondiente. En el apartado 13 de la ficha de datos de seguridad encontrará información general relativa a este producto.

4.6 Kits de prueba dañados

En caso de que el kit de prueba o alguno de sus componentes estén dañados, se deberá comunicar a DEMEDITEC por escrito como máximo una semana después de la recepción del kit. Los componentes dañados no deben usarse en ninguna serie de prueba. Deberán guardarse hasta que el asunto se resuelva. Tras ello, deberán desecharse siguiendo la regulación oficial en vigor.

5 TOMA DE LA MUESTRA, ALMACENAMIENTO Y PREPARACIÓN

En este ensayo pueden ser usados los tipos de muestra detallados a continuación:

Suero humano o plasma con EDTA

En el ensayo no deben usarse muestras que contengan azida de sodio. En términos generales, absténgase de usar muestras hemolíticas, lipémicas o con ictericia. Para obtener más información, consulte el capítulo «*Sustancias interferentes*».

Las condiciones de obtención de muestras deben ser controladas con precaución ya que la secreción de renina puede ser influenciada por una serie de factores fisiológicos. Entre ellos se incluyen:

- **La postura:** el paciente ha de haber estado tumbado durante más de una hora o erguido durante más de una hora.
- **Oscilaciones de los niveles de renina diarios:** las muestras deben tomarse entre las 7 AM y las 10 AM si es posible.
- **Dieta:** el contenido en sodio de la dieta debe ser conocido y eventualmente verificado midiendo la natriuria a lo largo de un período de 24 horas
- **Medicación:** el nivel de renina activa puede ser afectado por medicación antihipertensiva (ej. diuréticos, inhibidores ACE, agentes bloqueadores beta- adrenérgicos o vasodilatadores)
- **Embarazo:** los niveles de renina inactiva y activa aumentan durante el embarazo
- **Ciclo menstrual:** los niveles de renina activa aumentan en la segunda fase del ciclo (si es posible, la obtención de muestras ha de realizarse durante la primera fase)
- **Edad:** los niveles de renina activa disminuyen con la edad

5.1 Toma de muestras

Suero: Extraiga sangre mediante venipuntura (p. ej., Sarstedt Monovette para suero), deje que coagule y separe el suero mediante centrifugado a temperatura ambiente. No centrifugue hasta que la coagulación se realice por completo. Puede que las muestras de los pacientes sometidos a terapia anticoagulante necesiten más tiempo para coagularse.

Plasma: Se debe extraer sangre total en tubos de centrifugado que contengan anticoagulante (p. ej., Sarstedt Monovette con la preparación de plasma que corresponda) y centrifugarse inmediatamente después de haberse extraído.

La sangre total no debe congelarse antes del centrifugado.

5.2 Almacenamiento de muestras

Las muestras deben almacenarse cerradas herméticamente antes de realizar el ensayo. Si se van a almacenar congeladas, se pueden congelar solo una vez. Las muestras descongeladas se deben invertir varias veces antes de analizarlas.

| | | | |
|-------------|---------------------------|----------------|---|
| Estabilidad | entre 2 °C y 8 °C | Inestable | <p>Almacenar a temperatura ambiente y NO a 2 °C a 8 °C antes del procesamiento, ya que la crioactivación de la prorenina puede ocurrir en el rango de temperatura de 2 °C a 8 °C, dando valores falsos positivos de renina activa > 128 pg/mL (12,13, 14).</p> <p>Para inactivar la Prorenina activada, incube la muestra durante la noche a 37 °C y repita la medición.</p> <p>Si las muestras no pueden analizarse <u>en las 4 horas siguientes</u> a su recogida, consérvelas congeladas.</p> <p>Se recomienda congelar rápidamente, y descongelar las muestras evitando el rango de temperatura de 2 °C a 8 °C. Puede utilizarse un baño de hielo seco/etanol para los procedimientos de congelación rápida.</p> |
| | a temperatura ambiente | < 4 horas | |
| | a ≤ -20 °C (en alícuotas) | hasta 12 meses | |

5.3 Preparación de las muestras

Las muestras se pueden analizar sin ninguna preparación adicional. Si en un ensayo inicial, se encuentra que una muestra contiene más analito que el estándar más alto, la muestra puede diluirse con *Assay Buffer* y reanalizarse como se describe en el procedimiento de ensayo.

Nota importante: los valores superiores al estándar más alto (> 128 pg/mL) pueden deberse a

1. Concentraciones muy altas de Renina (sólo en casos raros). En este caso, por favor siga las instrucciones para dilución dadas abajo.
2. Crioactivación de la Prorenina a Prorenina activada debido a un almacenamiento inadecuado de la muestra. En este caso siga las instrucciones dadas en el capítulo 5.2

Si se requiere una dilución, la muestra debe diluirse al menos 1:10 con *Assay Buffer*. Para el cálculo de las concentraciones debe tenerse en cuenta este factor de dilución.

Ejemplo:

- a) dilución 1:10: 10 μ L muestra + 90 μ L *Assay Buffer*; (*Mezcle bien*).
- b) dilución 1:100: 10 μ L dilución a) 1:10 + 90 μ L *Assay Buffer*; (*Mezcle bien*).

6 PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

6.1 Notas sobre el procedimiento

- Todos los reactivos y muestras deben estar a temperatura ambiente (entre 20 °C y 26 °C) antes de usarlos.
- Todos los reactivos deben mezclarse sin que generen espuma.
- No intercambie los tapones de los viales de reactivo para evitar posibles contaminaciones cruzadas.
- Use puntas de pipeta de plástico desechables nuevas con cada estándar, control o muestra para evitar posibles contaminaciones por arrastre.
- Para evitar posibles contaminaciones cruzadas y resultados engañosamente elevados, pipetee las muestras de paciente y dispense conjugado sin salpicar de forma minuciosa en el fondo de los pocillos.
- Mezcle bien el contenido de los pocillos de la placa de microtítulo para procurar que los resultados de la prueba sean correctos.
- No deje que los pocillos se sequen durante el ensayo; añada reactivo inmediatamente una vez acabados los pasos de enjuagado.
- Una vez iniciada la prueba, todos los pasos se deben completar de forma ininterrumpida y en la misma secuencia de cada paso.
- La reacción enzimática es linealmente proporcional al tiempo y la temperatura.
- La densidad óptica es una función del tiempo y la temperatura de incubación. Es importante respetar los tiempos y las temperaturas de incubación que se indican en el capítulo «Procedimiento de la prueba».
- Antes de iniciar el ensayo, se recomienda tener todos los reactivos listos, los tapones quitados, todos los pocillos necesarios fijados en el soporte, etc. De este modo, se asegurará de que el tiempo que va a transcurrir en cada paso de pipeteo es el mismo y sin interrupción alguna.
- **Nota importante sobre el procedimiento de lavado:**
El lavado es tremendamente importante. Con unos pocillos mal lavados se obtendrán resultados engañosos. La sensibilidad y la precisión de este ensayo dependen enormemente de un correcto rendimiento del procedimiento de lavado.
- **Rendimiento de pruebas mediante aparatos de análisis completamente automáticos:**
Se puede obtener un rendimiento de pruebas automático usando aparatos de análisis de sistema abierto y completamente automáticos. Sin embargo, la combinación debe estar validada por el usuario.

6.2 Procedimiento de la prueba

Cada serie debe incluir una curva estándar. Los controles actúan como controles internos de la fiabilidad del procedimiento del test. Se deben analizar en cada serie de prueba. El procedimiento de prueba aquí indicado describe un procesamiento manual.

Nota importante: La precisión de este ensayo depende enormemente de que haya una temperatura y un tiempo de incubación correctos, así como de los volúmenes de pipeteo correctos.

1. Fije la cantidad de pocillos de microtítulo que desee en el soporte del bastidor.
2. Pipetee **150 µL** de **Assay Buffer** en los pocillos correspondientes.
3. Pipetee **50 µL** de cada **Standard**, cada **Control** y cada **muestra** con puntas nuevas desechables en los pocillos correspondientes.
Mezcle bien durante 10 segundos. En este paso es importante que todo quede bien mezclado.
4. Incubar durante **90 minutos** a temperatura ambiente en un agitador de placas a 400 rpm.
5. Lave los pocillos del siguiente modo:
Si el paso de lavado se efectúa manualmente:
Agite enérgicamente el contenido de los pocillos.
Enjuague los pocillos **4 veces** con **300 µL** de solución de lavado diluida por pocillo.
Si se usa un aparato de lavado automático de placas:
Enjuague los pocillos **4 veces** con **400 µL** de solución de lavado diluida por pocillo.
Al término de cada paso de lavado, frote bien los pocillos con papel absorbente para eliminar las gotas residuales!
6. Añada **100 µL** de **Enzyme Conjugate** en cada pocillo.
7. Incube durante **90 minutos** a temperatura ambiente en un agitador de placas a 400 rpm.
8. Lavar los pocillos como se describe en el paso 5.
9. Pipetee **100 µL** de **Substrate Solution** en cada pocillo.
10. Incube durante **15 minutos** a temperatura ambiente.
11. Detenga la reacción enzimática añadiendo **100 µL** de **Stop Solution** a cada pocillo.
12. Mida la densidad óptica (DO) de la solución a **450 nm (lectura) y entre 620 nm y 630 nm (reducción del fondo, recomendada)** con un lector de placas de microtítulo. Se recomienda realizar la lectura de los pocillos **en los 10 minutos** siguientes a la incorporación de la solución de parada.

6.3 Cálculo de los resultados

1. La concentración de las muestras se puede leer directamente de la curva estándar.
2. Para determinar los duplicados, se debe hacer la media de los dos valores de densidad óptica (DO) de cada estándar, cada control y cada muestra de paciente. Si estos dos valores se desvían considerablemente el uno de otro, DEMEDITEC recomienda volver a analizar las muestras.
3. Las muestras con una concentración superior al estándar más elevado pueden diluirse adicionalmente con *Assay Buffer* y volverse a analizar siguiendo las instrucciones de «Procedimiento de la prueba», o bien comunicarse como > 128 pg/mL.
En el cálculo de las concentraciones se debe tener en cuenta este factor de dilución.
4. Método automático:
Los resultados de estas instrucciones de uso se han calculado automáticamente mediante un ajuste de curva de una función logística de cuatro parámetros (4PL). (Los métodos de preferencia son 4PL Rodbard o 4PL Marquardt.) Otras funciones de reducción de datos podrían arrojar resultados ligeramente distintos.
5. Método manual:
Usando un papel cuadrulado lineal, construya una curva estándar trazando el valor medio de densidad óptica obtenido de cada estándar en comparación con su concentración con un valor de densidad óptica en el eje vertical (Y) y la concentración en el eje horizontal (X). Determine la concentración de muestra correspondiente de la curva estándar usando el valor medio de densidad óptica de cada muestra.

6.3.1 Ejemplo de curva estándar típica

Los siguientes datos se proporcionan únicamente a título ilustrativo y **no** se pueden usar como reemplazo de las generaciones de datos en el momento de realizar el ensayo.

| Estándares | Densidad óptica (450 nm) |
|------------------------|--------------------------|
| Standard 0 (0 pg/mL) | 0,170 |
| Standard 1 (4 pg/mL) | 0,284 |
| Standard 2 (16 pg/mL) | 0,544 |
| Standard 3 (32 pg/mL) | 0,885 |
| Standard 4 (64 pg/mL) | 1,573 |
| Standard 5 (128 pg/mL) | 2,586 |

7 VALORES DE REFERENCIA

Se recomienda encarecidamente que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia. En un estudio con adultos aparentemente sanos utilizando el DEMEDITEC Renin ELISA se observaron los siguientes valores en plasma EDTA:

| Adultos sanos | n | Media (pg/mL) | Mediana (pg/mL) | Percentil 2,5 - 97,5 (pg/mL) | Rango (min. - max.) (pg/mL) |
|-------------------|----|---------------|-----------------|------------------------------|-----------------------------|
| Posición supina | 59 | 16,23 | 12,40 | < 2.50 – 53,83 | < 2.50 – 58,78 |
| Posición vertical | 59 | 19,73 | 16,18 | 2,79 – 61,83 | < 2.50 – 95,56 |

Estos valores también son válidos para el suero.

En un estudio realizado con adultos normales aparentemente sanos, usando la ELISA de DEMEDITEC Aldosterona (DE5298) y la ELISA de DEMEDITEC Renina (DE5125) se determinaron en plasma las siguientes **cocientes Aldosterona-Renina**:

Cociente Aldosterona-Renina (pg/mL / pg/mL)

| | n | Media | Mediana | Percentil 2,5 - 97,5 |
|---------------|----|-------|---------|----------------------|
| Adultos sanos | 89 | 8,68 | 5,30 | 0,52 – 37,83 |

Estos valores también son válidos para el suero.

Los valores por encima o por debajo del rango de referencia deben considerarse sospechosos y requieren una investigación adicional. Los resultados no deben ser el único motivo que justifique la aplicación de una terapia. Los resultados deben estar vinculados con otras observaciones clínicas y pruebas diagnósticas.

8 CONTROL DE CALIDAD

Una buena garantía de calidad en el laboratorio requiere el uso de controles con cada curva estándar. Es conveniente analizar una cantidad de controles estadísticamente significativa para poder establecer unos valores de media y unos intervalos aceptables que favorezcan un rendimiento adecuado. Se recomienda usar las muestras de control según las regulaciones estatales y federales. El uso de muestras de control es aconsejable para garantizar la validez de los resultados cada día. Use controles en niveles tanto normales como patológicos. Los controles y los resultados correspondientes del laboratorio de control de calidad figuran en el certificado de análisis (CoA) incluido con el kit. Los valores e intervalos reflejados en un CoA siempre se corresponden con el lote de kit actual, y deben usarse para cotejar los resultados de forma directa. Si los hay, también es recomendable participar en programas de control de calidad nacionales o internacionales para garantizar la precisión de los resultados. Emplee unos métodos estadísticos adecuados para analizar las tendencias y los valores de control. Si los resultados del ensayo no coinciden con los intervalos aceptables establecidos del material de control, los resultados de paciente deben considerarse como no válidos. En tal caso, compruebe las siguientes cuestiones técnicas: Aparatos de pipeteo y temporizadores; fotómetro, fechas de caducidad de los reactivos, condiciones de almacenamiento e incubación, métodos de aspiración y lavado. Si, una vez comprobadas todas estas cuestiones, sigue sin encontrar errores, póngase en contacto su distribuidor o directamente con DEMEDITEC.

9 CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

9.1 Especificidad de los anticuerpos (reactividad cruzada)

En la versión en inglés de las instrucciones de uso encontrará información pormenorizada sobre las sustancias analizadas.

9.2 Sensibilidad

| | |
|--------------------------------|-------------------------|
| Límite de blanco (LoB) | 2,499 pg/mL |
| Límite de detección (LoD) | 4,308 pg/mL |
| Límite de cuantificación (LoQ) | 6,021 pg/mL |
| | |
| Intervalo de medición | 2,499 pg/mL – 128 pg/mL |
| Intervalo lineal | 2,850 pg/mL – 128 pg/mL |

Encontrará información sobre lo siguiente:

9.3 Reproducibilidad (precisión)

9.4 Recuperación

9.5 Linealidad

9.6 Comparación del método

en la versión en inglés detallada de las instrucciones de uso.

10 LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Se obtendrán unos resultados fiables y reproducibles si el procedimiento de ensayo se lleva a cabo habiendo comprendido completamente las instrucciones de uso y observando las directrices de garantía de calidad del laboratorio. Manipular las muestras de forma indebida o alterar esta prueba podría influir en los resultados.

10.1 Sustancias interferentes

La hemoglobina (hasta 4 mg/mL), la bilirrubina (hasta 0,5 mg/mL) y los triglicéridos (hasta 30 mg/mL) no tienen efecto alguno en los resultados del ensayo.

10.2 Interferencias de medicamentos

Para obtener información sobre las sustancias (medicamentos) analizadas, consulte las instrucciones de uso detalladas en inglés.

10.3 Efecto gancho en concentraciones elevadas

No se aprecia ningún efecto gancho en concentraciones elevadas de hasta 8200 pg/mL de Renina.

11 CUESTIONES LEGALES

11.1 Fiabilidad de los resultados

La prueba se debe realizar siguiendo exactamente las instrucciones de uso del fabricante. Es más, el usuario debe cumplir estrictamente las directrices de garantía de calidad del laboratorio y las normas y/o legislaciones nacionales aplicables. Esto es especialmente relevante al usar reactivos de control. Es importante incluir siempre en el procedimiento de la prueba una cantidad suficiente de controles que validen la precisión de la prueba. Los resultados de la prueba serán válidos únicamente si todos los controles están dentro de los intervalos especificados y si todos los demás parámetros de la prueba están dentro también de las especificaciones del ensayo pertinentes. Si existe alguna duda o reparo en relación con un resultado, póngase en contacto con DEMEDITEC.

11.2 Aplicación de terapias

La aplicación de una terapia no debe estar justificada únicamente por los resultados de laboratorio, aun cuando todos los resultados de la prueba coincidan con lo establecido en el punto 11.1. Un resultado de laboratorio es solo una parte del cuadro clínico total de un paciente. La aplicación de una terapia solo estará justificada en aquellos casos en los que los resultados de laboratorio coincidan con el cuadro clínico general del paciente. El resultado de la prueba en sí no debe tomarse como único factor determinante de la aplicación de una terapia.

11.3 Responsabilidad

Cualquier alteración del kit de prueba y/o intercambio o mezcla de componentes de lotes distintos entre un kit de prueba y otro podría afectar negativamente a los resultados previstos y a la validez de la prueba en general. Tal alteración o intercambio invalidará cualquier reclamación de sustitución. Tampoco serán válidas las reclamaciones enviadas con motivo de una mala interpretación por parte del cliente de los resultados de laboratorio según el punto 11.2. Con independencia de todo esto, en caso de reclamación, la responsabilidad del fabricante no superará el valor del kit de prueba. Cualquier daño causado al kit de prueba durante su transporte quedará fuera de la responsabilidad del fabricante.

11.4 Información de incidentes graves

Cualquier incidente grave relacionado con el producto deberá comunicarse al fabricante y a la autoridad competente del Estado miembro en el que estén establecidos el usuario y/o el paciente.

1 DESTINATION DU DISPOSITIF

Le **DEMEDIATEC Renin ELISA** est un dosage immunoenzymatique manuel pour la mesure **quantitative** de la rénine active dans le sérum humain ou le plasma EDTA.

Destiné à une utilisation de diagnostic *in vitro*. Destiné à un usage professionnel en laboratoire.

Pour de plus amples informations sur l'usage prévu, veuillez vous reporter à la version anglaise du mode d'emploi.

2 PRINCIPE DU TEST

Le DEMEDIATEC Renin ELISA est un dosage d'immunoabsorption par enzyme (ELISA) en phase solide reposant sur le **principe de sandwich**. Les puits de microtitration sont recouverts d'un anticorps monoclonal (souris) dirigé vers un site antigénique unique de la molécule de rénine active humaine. Pendant la première incubation (avec le tampon d'essai), la rénine dans l'échantillon ajouté se lie à l'anticorps immobilisé. Après l'incubation, les composants non liés sont éliminés par lavage. Le conjugué enzymatique ajouté ensuite, qui contient un anticorps monoclonal dirigé contre rénine conjugué à de la peroxydase de raifort, se lie à la rénine en formant un complexe en sandwich. Après une étape de lavage pour éliminer tout le conjugué enzymatique non lié, la phase solide est incubée avec la solution de substrat. La réaction colorimétrique est arrêtée par l'ajout d'une solution d'arrêt, et la densité optique (DO) du produit jaune résultant est mesurée. L'intensité de couleur est proportionnelle à la concentration de l'analyte dans l'échantillon. Une courbe standard est construite en traçant les valeurs de DO en fonction des concentrations des standards, et les concentrations des échantillons inconnus sont déterminées en utilisant cette courbe standard.

3 AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS

- Ce kit est destiné exclusivement à une utilisation de diagnostic *in vitro*. Destiné uniquement à un usage professionnel en laboratoire.
- Lire attentivement toutes les instructions avant de commencer le dosage. Utiliser la version valide de la notice d'utilisation fournie avec la trousse. S'assurer que tout a bien été compris.
- Ne pas mélanger les composants des trousse et ne pas utiliser de composants de trousse portant des numéros de lot différents. Il est recommandé de ne pas intervertir les puits de différentes plaques, même s'ils appartiennent au même lot. Les trousse ont peut-être été expédiés ou conservés dans des conditions différentes et les caractéristiques de liaison des plaques peuvent légèrement différer.
- Ne pas utiliser de réactifs au-delà de la date d'expiration indiquée sur les étiquettes de la trousse.
- Ne pas réutiliser les puits de microtitration.
- Les réactifs d'autres fabricants ne doivent pas être utilisés avec les réactifs de cette trousse de test.
- Tous les réactifs de cette trousse sont des liquides clairs, la solution de substrat est claire et incolore. Des variations dans son apparence peuvent affecter la performance du test. Dans un tel cas, contactez DEMEDIATEC.
- La contamination microbienne des réactifs ou des échantillons peut entraîner des résultats erronés.
- Laisser les réactifs atteindre la température ambiante (20 °C à 26 °C) avant de commencer le test. La température affecte la lecture de la densité optique du test.
- Tous les volumes indiqués doivent être réalisés conformément au protocole. Des résultats de tests optimaux ne sont possibles qu'avec des pipettes et des lecteurs de microplaques calibrés.
- N'utilisez les réservoirs que pour des réactifs uniques. Ceci s'applique particulièrement aux réservoirs de substrat. L'utilisation d'un réservoir pour distribuer une solution de substrat qui avait été précédemment utilisé pour la solution de conjugué peut colorer la solution. Ne pas verser les réactifs dans les flacons d'origine, car cela pourrait contaminer les réactifs.

Précautions générales

- Suivre les directives relatives à l'assurance qualité et à la sécurité au laboratoire.
- Ne jamais les pipeter à la bouche et éviter tout contact des réactifs et des échantillons avec la peau ou les muqueuses.
- Ne pas fumer, boire, manger ni utiliser des cosmétiques dans les zones de manipulation des échantillons ou de réactifs de la trousse.

- Porter des blouses de laboratoire et des gants en latex jetables lors de la manipulation des échantillons et des réactifs et, si nécessaire, des lunettes de sécurité.

Informations sur les risques biologiques

- Tous les réactifs de cette trousse de test contenant du sérum ou du plasma humain ont été testés et confirmés négatifs pour le VIH I/II, le HBsAg et le VHC par les procédures approuvées par la FDA. Cependant, aucune méthode d'essai connue ne peut offrir une garantie totale qu'aucun agent infectieux n'est présent.
- Le dispositif contient des matières d'origine animale, qui sont certifiées apparemment exemptes de maladies infectieuses ou contagieuses et de parasites nuisibles.
- Les composants bovins proviennent de pays où l'ESB (encéphalopathie spongiforme bovine) n'a pas été signalée.
- Tous les matériaux et échantillons d'origine humaine ou animale doivent être manipulés comme susceptibles de transmettre des maladies infectieuses.
- La manipulation doit être conforme aux procédures définies par les directives ou règlements nationaux concernant la sécurité et les déchets à risque biologique. Les déchets doivent être mis au rebut conformément aux règles et réglementations locales.

Informations sur les risques chimiques et classification des risques

- Certains réactifs contiennent des agents de conservation à des concentrations non soumises à une obligation de déclaration. Toutefois, en cas de contact avec les yeux ou la peau, rincer immédiatement à l'eau.
- La solution de substrat contient un ingrédient à des concentrations non soumises à une obligation de déclaration, qui provoque une grave irritation des yeux. En cas de contact possible avec les yeux, rincer immédiatement et soigneusement au moyen d'une douche oculaire ou à l'eau. En cas de contact avec la peau, rincer abondamment à l'eau. Enlever les vêtements contaminés et les laver avant de les porter de nouveau.
- Éviter le contact avec la solution d'arrêt, qui contient < 5 % de H₂SO₄. Elle pourrait provoquer une irritation de la peau et des brûlures.
- Les produits chimiques et les réactifs préparés ou utilisés doivent être considérés comme des déchets dangereux conformément à la réglementation ou aux directives de sécurité nationales.
- Ce produit ne contient pas de substances ayant des propriétés cancérigènes, mutagènes ou toxiques pour la reproduction (CMR).

4 MATÉRIAUX

4.1 Matériaux fournis avec la trousse

1. **SORB** **MT** **Microtiterwells** 12 x 8 puits (divisibles), prêt à l'emploi; Microplaque, recouvert d'un anticorps anti-rénine (monoclonal).
2. **CAL** **0** – **5** **LYO** **Standard (Standard 0-5)**, 6 x 1 mL, lyophilisés; voir « Préparation des réactifs »; Standards*, Concentrations: 0 – 4 – 16 – 32 – 64 – 128 pg/mL; Conversion: 1 pg/mL = 1,44 µIU/mL; Calibré par rapport au matériau de référence suivant: WHO 1st International Standard for Renin 68/356.
3. **CONTROL** **low** & **high** **LYO** **Control Low & High** 2 x 1 mL, lyophilisés; voir « Préparation des réactifs »; Contrôles*, pour les valeurs de contrôle et les plages de valeurs, veuillez vous référer à l'étiquette du flacon ou au certificat d'analyse (CoA).
4. **BUF** **Assay Buffer** 1 x 20 mL, prêt à l'emploi; Tampon d'essai*.
5. **ENZ** **CONJ** **Enzyme Conjugate** 1 x 14 mL, prêt à l'emploi; Conjugué enzymatique*, anticorps (monoclonal) dirigé contre la rénine humaine conjugué à de la peroxydase de raifort.
6. **SUB** **TMB** **Substrate Solution** 1 x 14 mL, prêt à l'emploi; Solution de substrat, contient du 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB). Tenir à l'écart de la lumière directe du soleil.
7. **STOP** **SOLN** **Stop Solution** 1 x 14 mL, prêt à l'emploi; Solution d'arrêt, contient < 5 % de H₂SO₄. Éviter les contacts avec la solution stop. Cela pourrait engendrer des irritations ou brûlures de la peau.
8. **WASH** **SOLN** **40x** 1 x 30 mL, voir « Préparation des réactifs ». Solution de lavage, concentré 40X*.
9. 1x **Notice d'utilisation (IFU)**; 1x **Certificat d'analyse (CoA)**

* Contient un agent de conservation sans mercure.

4.2 Matériel nécessaire mais non fourni

- Un lecteur de microplaques calibré (450 nm, avec une longueur d'onde de référence de 620 nm à 630 nm)
- Micropipettes calibrées à précision variable
- Incubateur pour 37 °C
- Équipement manuel ou automatique pour le rinçage des puits de microplaques
- Papier absorbant
- Eau distillée
- Minuterie
- Papier graphique ou logiciel pour la réduction des données
- Agitateur de microplaques (400 rpm)

4.3 Stockage et stabilité du kit

Les kits et réactifs non ouverts ainsi que **les réactifs ouverts** doivent être conservés à une température entre 2 °C et 8 °C. La microplaque doit toujours être conservée dans une poche en aluminium scellée contenant un absorbeur d'humidité. Ne pas ouvrir la poche avant qu'elle n'ait atteint la température ambiante. La microplaque est composée de 12 bandes individuelles. Chaque bande peut être divisée en 8 puits individuels. Les puits non utilisés doivent être immédiatement replacés dans la poche en aluminium contenant l'absorbeur d'humidité, scellés hermétiquement et conservés à une température comprise entre 2 °C et 8 °C. Une fois ouverts, les flacons de réactifs doivent être refermés hermétiquement.

| | Température de stockage | Stabilité |
|--|-------------------------|--|
| Kit non ouvert et réactifs non ouverts | 2 °C à 8 °C | Jusqu'à la date d'expiration imprimée sur l'étiquette. Ne pas utiliser les réactifs au-delà de cette date ! |
| Kit ouvert | 2 °C à 8 °C | 8 semaines (Pour les réactifs reconstitués, voir « 4.4 Préparation des réactifs »). |

4.4 Préparation des réactifs

Amener tous les réactifs et le nombre requis de bandes à température ambiante (20 °C à 26 °C) avant de les utiliser.

Standards

Reconstituer le contenu lyophilisé de chaque flacon de standard avec 1 mL d'eau distillée et laisser reposer pendant au moins 10 minutes à température ambiante. Mélanger plusieurs fois avant utilisation.

| | | |
|------------------------------------|-------------------------|-----------------|
| Stabilité après la reconstitution: | entre 2 °C et 8 °C | 14 jour |
| | à -20 °C (en aliquotes) | jusqu'à 12 mois |

Controls

Reconstituer le contenu lyophilisé de chaque flacon de contrôle avec 1 mL d'eau distillée et laisser reposer pendant au moins 10 minutes à température ambiante. Mélanger plusieurs fois avant utilisation.

| | | |
|------------------------------------|-------------------------|-----------------|
| Stabilité après la reconstitution: | entre 2 °C et 8 °C | 14 jour |
| | à -20 °C (en aliquotes) | jusqu'à 12 mois |

Wash Solution

Ajouter l'eau distillée à la solution de lavage concentrée à 40x (*Wash Solution*). Diluer 30 mL de solution de lavage concentrée avec 1170 mL d'eau distillée pour un volume final de 1200 mL.

| | | |
|---------------------------|----------------------|-----------|
| Stabilité après dilution: | entre 20 °C et 26 °C | 1 semaine |
|---------------------------|----------------------|-----------|

4.5 Élimination du kit

L'élimination du kit et de tout le matériel/tous les réactifs doit être conforme aux réglementations nationales. Des informations spécifiques au produit sont indiquées dans la fiche de données de sécurité, section 13.

4.6 Kits de tests endommagés

En cas de dommage du kit de tests ou de ses composants, DEMEDITEC doit en être informé par écrit, au plus tard une semaine après réception du kit. Les composants endommagés ne doivent pas être utilisés pour le test. Ils doivent être stockés jusqu'à ce qu'une solution adaptée ait été trouvée. Après cela, ils doivent être éliminés conformément à la réglementation en vigueur.

5 PRÉLÈVEMENT, STOCKAGE ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Le matériau d'échantillon suivant peut être utilisé dans ce test:

Sérum humain ou plasma EDTA

Les échantillons contenant de l'azoture de sodium ne doivent pas être utilisés dans le test. En général, il faut éviter d'utiliser des échantillons hémolytiques, ictériques ou lipémiques. Pour de plus amples informations, se reporter au chapitre « *Substances interférentes* ».

Les conditions de prélèvement des échantillons doivent être strictement contrôlées, car un certain nombre de facteurs physiologiques peuvent influencer la sécrétion de rénine, notamment :

- **Position** : le patient doit être allongé ou debout depuis plus d'1 heure
- **Variations journalières du niveau de rénine** : le prélèvement doit avoir lieu si possible entre 7 heures et 10 heures du matin
- **Régime alimentaire** : la quantité de sodium dans le régime alimentaire doit être connue et vérifiée par une mesure de natriurie sur une période de 24 heures
- **Médication** : le niveau de rénine active peut être influencé par un traitement antihypertenseur (par ex. diurétiques, inhibiteurs de l'ECA, bêta-bloquants, vasodilatateurs, inhibiteurs de la rénine)
- **Grossesse** : le niveau de rénine active et inactive augmente pendant la grossesse
- **Cycle menstruel** : le niveau de rénine active augmente lors de la deuxième phase du cycle (le prélèvement doit être effectué, si possible, lors de la première phase)
- **Âge** : le niveau de rénine active diminue avec l'âge

5.1 Prélèvement des échantillons

Sérum: Prélever le sang par ponction veineuse (ex. Sarstedt Monovette pour le sérum), laisser coaguler et extraire le sérum par centrifugation à température ambiante. Ne pas centrifuger avant la coagulation complète. Le temps de coagulation peut être plus long chez les patients sous traitement anticoagulant.

Plasma: Prélever le sang total dans des tubes de centrifugation contenant un anticoagulant (ex. Sarstedt Monovette avec la préparation de plasma adéquate) et centrifuger immédiatement après le prélèvement.

Le sang total ne doit pas être congelé avant la centrifugation.

5.2 Stockage des échantillons

Les échantillons doivent être conservés hermétiquement fermés avant d'effectuer le dosage. S'ils sont conservés au congélateur, ne les congeler qu'une seule fois. Les échantillons décongelés doivent être retournés plusieurs fois avant le test.

| | | | |
|------------|---------------------------|-----------------|---|
| Stabilité: | entre 2 °C et 8 °C | NON stable | <p>Conserver à température ambiante et NON entre 2 °C et 8 °C avant le traitement, car la cryoactivation de la prorénine peut se produire dans la plage de température de 2 °C à 8 °C, donnant des valeurs faussement positives de rénine active > 128 pg/mL (12,13, 14). Pour inactiver la prorénine activée, incuber l'échantillon pendant une nuit à 37 °C et répéter la mesure.</p> <p>Si les échantillons ne peuvent pas être testés dans les 4 heures suivant le prélèvement, les conserver à l'état congelé. Il est recommandé de congeler et de décongeler rapidement les échantillons en évitant les températures comprises entre 2 °C et 8 °C. Un bain de glace sèche/éthanol peut être utilisé pour les procédures de congélation rapide.</p> |
| | à température ambiante | < 4 heures | |
| | à ≤ -20 °C (en aliquotes) | jusqu'à 12 mois | |

5.3 Préparation des échantillons

Les échantillons peuvent être dosés sans préparation supplémentaire. Si, lors d'un premier dosage, il s'avère qu'un échantillon contient plus d'analyte que l'étalon le plus élevé, l'échantillon peut être dilué avec *Assay Buffer* et testé à nouveau comme décrit dans la procédure de dosage.

Remarque importante : les valeurs supérieures à l'étalon le plus élevé (> 128 pg/mL) peuvent être dues à :

1. Des concentrations très élevées de rénine (seulement dans de rares cas). Dans ce cas, suivre les instructions de dilution données ci-dessous.
2. La cryoactivation de la Prorénine en Prorénine activée due à un stockage inapproprié de l'échantillon. Dans ce cas, suivre les instructions données au chapitre 5.2.

Si une dilution est nécessaire, l'échantillon doit être dilué au moins à 1:10 avec le *Assay Buffer*. Pour le calcul des concentrations, ce facteur de dilution doit être pris en compte.

Exemple:

- a) dilution 1:10: 10 µL de l'échantillon + 90 µL *Assay Buffer* (bien mélanger).
b) dilution 1:100: 10 µL dilution a) 1:10 + 90 µL *Assay Buffer* (bien mélanger).

6 PROCÉDURE DE DOSAGE

6.1 Notes de procédure

- Tous les réactifs et échantillons doivent être amenés à température ambiante (entre 20 °C et 26 °C) avant d'être utilisés.
- Tous les réactifs et échantillons doivent être mélangés sans mousse.
- Ne pas interchanger les bouchons des flacons de réactifs pour éviter toute contamination croisée.
- Utiliser des embouts de pipette en plastique neufs pour chaque standard, contrôle ou échantillon afin d'éviter tout transfert.
- Pour éviter la contamination croisée et des résultats faussement élevés, pipeter les échantillons du patient et distribuer le conjugué sans éclabousser précisément le fond des puits.
- Mélanger soigneusement le contenu des puits de la microplaque pour garantir de bons résultats.
- Ne pas laisser les puits sécher pendant le dosage ; ajouter les réactifs immédiatement après avoir terminé les étapes de rinçage.
- Une fois le test lancé, toutes les étapes doivent être réalisées sans interruption et dans le même ordre pour chaque étape.
- La réaction enzymatique est linéairement proportionnelle au temps et à la température.
- La densité optique dépend du temps d'incubation et de la température. Respecter les temps et températures d'incubation indiqués dans le chapitre « Procédure de test ».
- Avant de commencer le dosage, il est recommandé que tous les réactifs soient prêts, les bouchons retirés, tous les puits nécessaires fixés dans le support, etc. Cela permet de garantir un temps égal pour chaque étape de pipetage sans interruption.
- **Remarque importante pour la procédure de lavage:**
Le lavage est essentiel. Des puits mal lavés donneront des résultats erronés. La sensibilité et la précision de ce dosage sont fortement influencées par l'exécution correcte de la procédure de lavage!
- **Réalisation de tests avec des dispositifs d'analyse entièrement automatisés:**
Il est possible d'effectuer des tests automatisés au moyen de dispositifs d'analyse entièrement ouverts automatisés. Toutefois, la combinaison doit être validée par l'utilisateur.

6.2 Procédure de test

Chaque cycle doit inclure une courbe standard. Les contrôles servent de contrôles internes pour la fiabilité de la procédure de test. Ils doivent être dosés lors de chaque cycle de tests. La procédure de test décrite correspond à un traitement manuel.

Remarque importante: La précision de ce test est fortement influencée par le respect de la température et du temps d'incubation et par des volumes de pipetage corrects.

1. Fixer le nombre souhaité de puits de microtitration dans le support du cadre.
2. Pipeter **150 µL** de **Assay Buffer** dans les puits correspondants.
3. Pipeter **50 µL** de chaque standard (**Standard**), contrôle (**Control**) et **échantillon avec de nouveaux embouts jetables** dans les puits correspondants.
Bien mélanger pendant 10 secondes. Il est important d'avoir un mélange complet à cette étape.
4. Incuber pendant **90 minutes** à température ambiante sur un agitateur de plaque à 400 rpm.
5. Laver les puits comme suit:
Si l'étape de lavage est effectuée à la main:
Agiter énergiquement le contenu des puits.
Rincer les puits à **4 reprises** avec **300 µL** de solution de lavage diluée par puits.
Si un laveur de plaques automatique est utilisé:
Rincer les puits à **4 reprises** avec **400 µL** de solution de lavage diluée par puits.
À la fin de l'étape de lavage, toujours frapper énergiquement les puits sur du papier absorbant pour éliminer les gouttelettes résiduelles.
6. Ajouter **100 µL** de conjugué enzymatique (**Enzyme Conjugate**) dans chaque puits.
7. Incuber pendant **90 minutes** à température ambiante sur un agitateur de plaque à 400 rpm..
8. Laver les puits comme décrit à l'étape 5.
9. Pipeter **100 µL** de solution de substrat (**Substrate Solution**) dans chaque puits.
10. Incuber pendant **15 minutes** à température ambiante.
11. Arrêter la réaction enzymatique en ajoutant **100 µL** de solution d'arrêt (**Stop Solution**) dans chaque puits.
12. Mesurer la densité optique (DO) de la solution dans chaque puits à **450 nm (lecture) et à 620 nm à 630 nm (soustraction des bruits de fond, recommandé)** avec un lecteur de microplaques.
Il est recommandé de lire les puits dans un délai de **10 minutes** après l'ajout de la solution d'arrêt.

6.3 Calcul des résultats

1. La concentration des échantillons peut être lue directement à partir de la courbe standard.
2. Pour les déterminations en double, prendre la moyenne des deux valeurs de densité optique (DO) pour chaque standard, contrôle et échantillon de patient. Si les deux valeurs s'écartent considérablement l'une de l'autre, DEMEDITEC recommande de tester à nouveau les échantillons.
3. Les échantillons dont la concentration est supérieure à l'étalon le plus élevé peuvent être dilués davantage avec *Assay Buffer* et dosés à nouveau comme décrit dans la section « Procédure de test » ou doivent être signalés comme > 128 pg/mL. Pour le calcul des concentrations, ce facteur de dilution doit être pris en compte.
4. Méthode automatisée:
Les résultats figurant dans les instructions d'utilisation ont été calculés automatiquement en utilisant un ajustement de la courbe logistique à quatre paramètres (4 PL). (Les méthodes privilégiées sont les modèles logistiques à quatre paramètres [4 PL] de Rodbard ou de Marquardt.) D'autres fonctions de réduction des données peuvent donner des résultats légèrement différents.
5. Méthode manuelle:
Avec du papier graphique linéaire, construire une courbe standard en traçant la DO (moyenne) obtenue à partir de chaque standard en fonction de sa concentration avec la valeur de la DO sur l'axe vertical (Y) et la concentration sur l'axe horizontal (X). Déterminer la concentration correspondante de l'échantillon à partir de la courbe standard en utilisant la valeur (moyenne) de la DO pour chaque échantillon.

6.3.1 Exemple de courbe standard caractéristique

Les données suivantes ont uniquement une fin de démonstration et **ne peuvent pas** être utilisées à la place des générations de données au moment du dosage.

| Standard | Densité optique (450 nm) |
|------------------------|--------------------------|
| Standard 0 (0 pg/mL) | 0,170 |
| Standard 1 (4 pg/mL) | 0,284 |
| Standard 2 (16 pg/mL) | 0,544 |
| Standard 3 (32 pg/mL) | 0,885 |
| Standard 4 (64 pg/mL) | 1,573 |
| Standard 5 (128 pg/mL) | 2,586 |

7 VALEURS DE RÉFÉRENCE

Il est fortement recommandé à chaque laboratoire de déterminer ses propres valeurs de référence. Dans une étude menée sur des adultes apparemment sains, à l'aide du test Renin ELISA de DEMEDITEC, les valeurs suivantes ont été observées dans le plasma EDTA :

| Healthy Adults | n | Valeur moyenne (pg/mL) | Médiane (pg/mL) | 2,5. - 97,5. Percentile (pg/mL) | Portée (min. - max.) (pg/mL) |
|-------------------|----|------------------------|-----------------|---------------------------------|------------------------------|
| Position allongée | 59 | 16,23 | 12,40 | < 2,50 – 53,83 | < 2,50 – 58,78 |
| Position debout | 59 | 19,73 | 16,18 | 2,79 – 61,83 | < 2,50 – 95,56 |

Ces valeurs sont également valables pour le sérum.

Dans une étude menée avec des adultes en bonne santé apparemment normaux, en utilisant DEMEDITEC Aldosterone ELISA (DE5298) et DEMEDITEC Renin ELISA, **les rapports Aldosterone-Renin** suivants ont été déterminés dans le plasma EDTA:

Rapport Aldosterone-Renin (pg/mL / pg/mL)

| | n | Valeur moyenne | Médiane | 2,5. - 97,5. Percentile |
|---------------|----|----------------|---------|-------------------------|
| Adultes sains | 89 | 8,68 | 5,30 | 0,52 - 37,83 |

Ces valeurs sont également valables pour le sérum.

Les valeurs supérieures ou inférieures à la plage de référence doivent être considérées comme suspectes et nécessitent des examens complémentaires. Les résultats ne doivent pas être utilisés seuls pour déterminer les décisions thérapeutiques. Ils doivent être corrélés avec d'autres observations cliniques et tests diagnostiques.

8 CONTRÔLE DE QUALITÉ

Une bonne assurance qualité au laboratoire exige que des contrôles soient effectués avec chaque courbe standard. Un nombre statistiquement significatif de contrôles doit être analysé afin d'établir les valeurs moyennes et les plages acceptables pour garantir une bonne performance. Il est recommandé d'utiliser les échantillons de contrôle conformément aux réglementations locales et nationales. L'utilisation d'échantillons de contrôle est conseillée pour assurer la validité jour par jour des résultats. Utiliser les contrôles au niveau normal et au niveau pathologique. Les contrôles et les résultats correspondants du laboratoire de contrôle de la qualité sont indiqués dans le certificat d'analyse (CoA) joint au kit. Les valeurs et les plages indiquées sur le « CoA » se rapportent toujours au lot actuel du kit et doivent être utilisées pour une comparaison directe des résultats. En cas de disponibilité, il est également recommandé de participer à des programmes nationaux ou internationaux d'évaluation de la qualité afin d'assurer l'exactitude des résultats. Appliquer les méthodes statistiques appropriées pour l'analyse des valeurs de contrôle et des tendances. Si les résultats du dosage ne concordent pas avec les intervalles acceptables établis du matériel de contrôle, les résultats de patient doivent être considérés comme invalides. Dans ce cas, veuillez vérifier les domaines techniques suivants: Dispositifs de pipetage et de chronométrage; photomètre, dates d'expiration des réactifs, conditions de stockage et d'incubation, méthodes d'aspiration et de lavage. Si aucune erreur n'est révélée par l'examen des éléments susmentionnés, veuillez contacter votre distributeur ou DEMEDITEC directement.

9 CARACTERISTIQUES EN MATIERE DE PERFORMANCES

9.1 Spécificité des anticorps (des réactions croisées)

Des informations détaillées sur les substances testées sont disponibles dans la version anglaise du mode d'emploi de la notice d'utilisation.

9.2 Sensibilité

| | |
|-----------------------------------|-------------------------|
| La limite du blanc (LoB) | 2,499 pg/mL |
| La limite de détection (LoD) | 4,308 pg/mL |
| La limite de quantification (LoQ) | 6,021 pg/mL |
| | |
| Plage de mesure | 2,499 pg/mL – 128 pg/mL |
| Plage linéaire | 2,850 pg/mL – 128 pg/mL |

Les données pour:

9.3 Reproductibilité (précision)

9.4 Récupération

9.5 Linéarité

9.6 Comparaison des méthodes

se trouvent dans la version anglaise détaillée du mode d'emploi.

10 LIMITES DE LA PROCÉDURE

Les résultats seront fiables et reproductibles si la procédure de dosage est effectuée dans le respect le plus strict de la notice d'utilisation et des directives relatives à l'assurance qualité en laboratoire. Toute manipulation incorrecte des échantillons ou toute modification de ce test peut affecter les résultats.

10.1 Substances interférentes

L'hémoglobine (jusqu'à 4 mg/mL), la bilirubine (jusqu'à 0,5 mg/mL) et les triglycérides (jusqu'à 30 mg/mL) n'ont aucune influence sur les résultats du dosage.

10.2 Interférences médicamenteuses

Pour des informations sur les substances (médicaments) testées, veuillez vous référer au mode d'emploi détaillé en anglais.

10.3 Effet crochet

Aucun effet crochet n'a été observé pour ce test jusqu'à une concentration de 8200 pg/mL de rénine.

11 ASPECTS JURIDIQUES

11.1 Fiabilité des résultats

Le test doit être effectué exactement selon la notice d'utilisation du fabricant. En outre, l'utilisateur doit adhérer strictement aux directives d'assurance qualité en laboratoire et aux normes et/ou lois nationales applicables. Ceci s'applique en particulier dans le cadre de l'utilisation des réactifs de contrôle. Il est important de toujours inclure dans la procédure de test un nombre suffisant de contrôles pour valider l'exactitude et la précision du test. Les résultats de tests ne sont valides que si tous les contrôles se situent dans l'intervalle spécifié et que tous les autres paramètres de test correspondent également aux spécifications du dosage. En cas de doute ou de préoccupation relative à un résultat, veuillez contacter DEMEDITEC.

11.2 Décisions thérapeutiques

Les décisions thérapeutiques ne doivent jamais s'appuyer uniquement sur les résultats de laboratoire, même si tous les résultats de tests sont conformes aux critères définis au point 11.1. Tout résultat de laboratoire ne représente qu'une partie du tableau clinique global d'un patient. Des décisions thérapeutiques ne peuvent être prises que dans les cas où les résultats de laboratoire sont en accord avec le tableau clinique global du patient. Le résultat de test lui-même ne doit jamais être le seul critère déterminant la prise de décisions thérapeutiques.

11.3 Responsabilité

Toute modification du kit de test et/ou échange ou mélange de composants de différents lots de kits pourrait avoir un impact négatif sur les résultats escomptés et sur la validité du test global. De telles modifications et/ou de tels échanges invalident toute demande de remplacement. Les réclamations dues à une mauvaise interprétation des résultats de laboratoire par le client selon le point 11.2 sont également invalides. Quoi qu'il en soit, en cas de réclamation, la responsabilité du fabricant ne doit pas excéder la valeur du kit de test. Tout dommage causé au kit de test lors du transport ne relève pas de la responsabilité du fabricant.





11.4 Notification des incidents graves

Tout incident grave survenu en lien avec le dispositif fait l'objet d'une notification au fabricant et à l'autorité compétente de l'État membre dans lequel l'utilisateur et/ou le patient est établi.

12 LITERATURE

1. Imai T, Miyazaki H, Hirose S, et al. Cloning and sequence analysis of cDNA for human renin precursor. Proc. Natl. Acad. Sci. (1983) 80, 7405–7409.
2. Reudelhuber TL, Ramla D, Chiu L, et al. Proteolytic processing of human prorenin in renal and non-renal tissues. Kidney Int. (1994) 46, 1522–1524.
3. Neves FA, Duncan KG, Baxter JD. Cathepsin B is a prorenin processing enzyme. Hypertension (1996) 27, 514–517.
4. Müller DN, Luft FC. Direct renin inhibition with aliskiren in hypertension and target organ damage. Clin J Am Soc Nephrol. (2006) 1, 221-8.
5. Toffelmire EB, Slater K, Corvol P, et al. Response of plasma prorenin and active renin to chronic and acute alterations of renin secretion in normal humans. Studies using a direct immunoradiometric assay. J Clin Invest. (1989) 83, 679–687.
6. Carey RM, Padia SH. Angiotensin AT2 receptors: control of renal sodium excretion and blood pressure. Trends Endocrinol Metab. (2008) 19, 84-7.
7. Koepfen BM, Stanton BA. Renal Physiology (4th ed.). Philadelphia, PA. Mosby Physiology Monograph Series, 2007.
8. Navar LG, Inscho EW, Majid DSA, et al. Paracrine regulation of the renal microcirculation. Physiol. Rev. (1996) 76, 425–536.
9. Müller MW, Todorov V, Krämer BK, Kurtz A. Angiotensin II inhibits renin gene transcription via the protein kinase C pathway. Pflugers Arch. (2002) 444, 499-505.
10. Spät A, Hunyady L. Control of aldosterone secretion: a model for convergence in cellular signaling pathways. Physiol Rev. (2004) 84, 489-539.
11. Nguyen G., Delarue F., Burcklé C., et al. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. J Clin Invest. (2002) 109, 1417–1427.
12. Pitarresi TM., Rubattu S, Henrikson R, Sealey JE. Reversible cryoactivation of recombinant human prorenin. J.Biol.Chem. (1992) 267, 11753-9.
13. Nicar MJ. Specimen processing and renin activity in plasma. Clin. Chem. (1992) 38, 598.
14. Laghnam D. et al. Renin–Angiotensin–Aldosterone System and Immunomodulation: A State-of-the-Art Review. Cells (2021), 10, 1767.

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

| Symbol | English | Deutsch | Française | Espanol | Italiano |
|---|------------------------------------|--|--|---|-------------------------------------|
|  | European Conformity | CE-Konformitätskennzeichnung | Conforme aux normes européennes | Conformidad europea | Conformità europea |
|  | Consult instructions for use | Gebrauchsanweisung beachten | Consulter les instructions d'utilisation | Consulte las Instrucciones | Consultare le istruzioni per l'uso |
|  | In vitro diagnostic device | In-vitro-Diagnostikum | utilisation Diagnostic in vitro | Diagnóstico in vitro | Per uso Diagnostica in vitro |
|  | For research use only | Nur Forschungszwecke für | Seulement dans le cadre de recherches | Sólo para uso en investigación | Solo a scopo di ricerca |
|  | Catalogue number | Katalog-Nr. | Référence | Número de catálogo | No. di catalogo |
|  | Lot. No. / Batch code | Chargen-Nr. | No. de lot | Número de lote | Lotto no |
|  | Contains sufficient for <n> tests/ | Ausreichend für "n" Ansätze | Contenu suffisant pour "n" tests | Contenido suficiente para <n> ensayos | Contenuto sufficiente per "n" saggi |
|  | Note warnings and precautions | Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten | Avertissements et mesures de précaution font attention | Tiene en cuenta advertencias y precauciones | Annoti avvisi e le precauzioni |
|  | Storage Temperature | Lagerungstemperatur | Température de conservation | Temperatura de conservación | Temperatura di conservazione |
|  | Expiration Date | Mindesthaltbarkeitsdatum | Date limite d'utilisation | Fecha de caducidad | Data di scadenza |
|  | Legal Manufacturer | Hersteller | Fabricant | Fabricante | Fabbricante |
| <i>Distributed by</i> | Distributed by | Vertrieb durch | Distribution par | Distribución por | Distribuzione da parte di |
|  | Version | Version | Version | Versión | Versione |
|  | Single-use | Einmalverwendung | À usage unique | Uso único | Uso una volta |